

PRISCILA DABAGHI BARBOSA

***MECANISMO DE AÇÃO DA HISPIDULINA SOBRE O  
METABOLISMO ENERGÉTICO MITOCONDRIAL E ANÁLISE  
COMPARATIVA DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DA  
HISPIDULINA E EUPAFOLINA***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Eliane Merlin  
Rocha

CURITIBA

2003

## TERMO DE APROVAÇÃO

**PRISCILA DABAGHI BARBOSA**

### **ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DA HISPIDULINA SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO MITOCONDRIAL E ANÁLISE COMPARATIVA DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DA HISPIDULINA E EUPAFOLINA.**

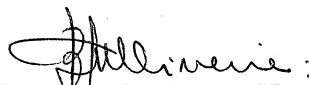
**Orientadora:**



Profª Drª Maria Eliane Merlin Rocha

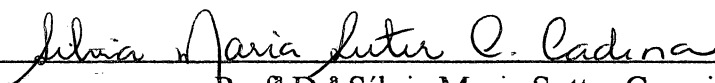
Setor de Ciências Biológicas – Departamento de Bioquímica – UFPR

**Membros:**



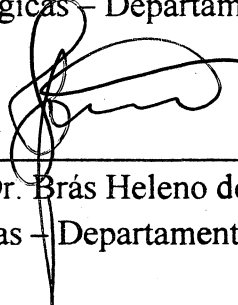
Profª Drª Maria Benigna Martinelli de Oliveira

Setor de Ciências Biológicas – Departamento de Bioquímica – UFPR



Profª Drª Sílvia Maria Sutter Correia Cadena

Setor de Ciências Biológicas – Departamento de Bioquímica – UFPR



Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira

Setor de Ciências Exatas – Departamento de Química - UFPR

Curitiba, 12 de fevereiro de 2003.

**Dissertação orientada pela**  
**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Eliane Merlin Rocha.**

*Somos "MAIS OU MENOS":*

*O MENOS requer paciência, dedicação e desapego*

*O MAIS requer antes de tudo, humildade para se entender  
que somos nada além de uma pequena parte da Natureza.*

*(Márcia Valério)*

*"Quando se busca o topo da montanha,  
não se dá importância às pedras do caminho"*

## DEDICATÓRIA

Meu querido e amado *Emerson*, agradeço pela imensa compreensão e estímulo em todos estes anos que estamos juntos. Foi no calor do seu beijo, no conforto dos seus braços, nas suas palavras de incentivo e principalmente na vontade de construir um futuro melhor ao teu lado que sempre encontrei a força necessária para seguir em frente.

À minha querida mãe *Luiza* agradeço pelo amor incondicional e amizade que sempre fez do nosso relacionamento algo tão especial e invejável, e principalmente por me incentivar sempre a ser uma pessoa melhor a cada dia que passa.

Aos queridos avós *vó Negra* e *vô Feres*, agradeço pelo imenso amor, carinho e constante apoio e incentivo que ajudaram a formar a pessoa que eu sou. Vô, que pena que você não esteja mais entre nós para comemorarmos juntos este importante momento da minha vida, mas sei que onde estiver estará todo feliz e orgulhoso. Vó, não tenho palavras suficientes para agradecer tudo o que você faz por mim (este trabalho teria mais umas 10 páginas se eu fosse listar tudo!), mas quero especialmente agradecer pela ajuda e apoio constante no meu dia-a-dia, pois pensando no meu bem-estar você abriu não só as portas da sua casa, mas também do seu imenso coração.

Agradeço à minha única e querida irmã *Loren* pela sua amizade de sempre.

Agradeço também de modo especial à querida e fiel *Cecília*, pelos vários maços de velinhas acendidas durante toda minha vida, a cada prova e trabalho, e é claro pela imensa dedicação e carinho.

*A vocês, com imenso amor e agradecimento  
dedico este trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

À *Deus*, o Criador, pois sem Ele nada é possível.

À *Profª Drª Maria Eliane Merlin Rocha*, pela sua paciência, dedicação e esmero na orientação deste trabalho, apesar de todas as dificuldades, e principalmente pela amizade, apoio e carinho durante nossa convivência.

À *Profª Drª Eva Gunilla Skare Carnieri*, pelas valiosas sugestões na correção dos relatórios e pela sua amizade e simpatia.

À *Profª Drª Maria Benigna Martinelli de Oliveira*, pelas importantes contribuições científicas no decorrer deste trabalho e pela amizade.

À *Profª Drª Sílvia Maria Suter Correia Cadena*, pelo grande apoio, incentivo e amizade que tornaram mais tranquilo o dia-a-dia no laboratório e pela paciência e exemplo a ser seguido com os alunos de graduação.

Ao *Profª Dr. Aguinaldo José do Nascimento*, pelas importantes sugestões na correção do projeto e pela valiosa ajuda na análise estatística dos resultados deste trabalho.

Ao *Profª Dr. Brás Heleno de Oliveira*, pelo fornecimento da hispidulina e eupafolina, pela condução nos experimentos no HPLC e valiosas sugestões para este trabalho.

Ao *Profª Dr. Philip Gorin*, pela gentileza de corrigir o abstract.

A todos os professores do Departamento de Bioquímica, que de maneira direta ou indireta contribuíram para minha formação.

À *Profª Regina Maria Vilela Babiak*, pelo apoio ao Mestrado, exemplo profissional a ser seguido e principalmente pela amizade. Obrigada por ser uma verdadeira fada-madrinha na minha vida profissional.

À *Dona Marilza Lamour*, secretária do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica.

Às bibliotecárias e funcionárias da biblioteca do Setor de Ciências Biológicas, especialmente *Telma, Ana e Isabela* pela dedicação e importante ajuda.

Aos colegas do laboratório de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular, que pela amizade tornaram mais agradável o trabalho realizado: *Ana Paula N. Newton, Andréia Senff Ribeiro, Guilhermina Noletto, Mariana Piemonte Moretão, Priscila Ianzen dos Santos, Sílvia Prado e Welligton Luciano Braguini*, este especialmente, pelo auxílio nos experimentos iniciais e empréstimos de protocolos e reagentes. Ao amigo *André Bellin Mariano* um agradecimento especial pelo companheirismo, amizade, apoio e grande ajuda nos experimentos.

Aos alunos de iniciação científica deste laboratório: *Anderson Lima* por conduzir parte dos experimentos com as enzimas; e à *Carol, Dani e Rodrigo* pela amizade.

Aos colegas do laboratório E-1 da Química de Carboidratos, pela companhia durante as intermináveis análises espectrofotométricas.

À toda galera do festerê na Suzi (à própria companheira Suzi e seu "Wilson" pelas berejas geladinhas), Caxambú, churrasco, etc., de modo especial ao amigo *Adriano Viana*, a figura que mais me diverte neste Departamento.

A todos os colegas do Departamento de Bioquímica pela convivência e amizade.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

**Não pensem que esqueci de vocês pois agora vem a galera do coração:**

Ao meu grande amigo *Daniel Kleine Santos*, simplesmente por ser meu "best friend".

Às amigas *Ana Paula Stier, Rosana Bogo, Tika, Bila, e Emeli* pela amizade e apoio.

Aos queridos, especiais e eternos amigos de turma de Mestrado: *Ana Claudia Bonatto* (Ana Cláudia das Dores) e seu respectivo "senhor" *Luís Favretto*; *André Bellin Mariano* (André Adolfo); *André Luís de Souza* (André Luís Adalberto); *Daniela Cristine Lopes* (*Daniela Elisângela*); *Elaine Carbonero* (Elaine Rebeca); *Farah Diba* (Farah de Lourdes); *Juliana Schimidt* (Juliana Mara); *Karen Rodrigues Raeder* (Karen Emanuely), seu respectivo senhor *Marcus Vinícius de Liz* e a gracinha da *Fer*; *Luísa Araújo* (Luísa Tissiany); *Marco André Cardoso* (Marco Lúcio) e sua respectiva senhora *Adriana*; *Mariana Araújo* (Mariana Creuza); *Ricardo Wagner* (Ricardo Moacir) e finalmente (capaiz ??!) *Thales Ricardo Cipriani* (Thales Thomé) e sua respectiva "senhora" *Patrícia*. A vocês, a *Priscielly Jacqueline* agradece do fundo do coração por tornar estes últimos dois anos tão especiais!!!

Seria injusto não agradecer de forma particular a dois dos amigos listados acima:

À minha grande amiga *Karen*, pelo "estudo comunitário" nos vários créditos, especialmente no Nivelamento, que nos fez tão amigas, não sei se sem a tua ajuda eu estaria aqui.

Ao meu querido amigo *Ricardo*, pela prova de amizade ao estar tantos dias (calor, chuva, frio) sempre com a maior boa-vontade para matar os ratinhos prá mim.

Além de tudo isso, agradeço muito a vocês pela imensa amizade e apoio nos bons e maus momentos, vocês são muito especiais para mim.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS E ESQUEMAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	xv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xv
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1 ESTRUTURA E BIOSÍNTESE DOS FLAVONÓIDES.....	4
1.2 EFEITOS BIOLÓGICOS DOS FLAVONÓIDES.....	10
1.3 Correlação entre Atividade Biológica e Estrutura dos Flavonóides.....	14
1.3.1 Grupamentos Hidroxila.....	15
1.3.2 Duplas Ligações entre C-2 e C-3 e Grupo Ceto em C-4.....	18
1.3.3 Grupamentos Metoxila.....	19
1.3.4 Características Estruturais dos Flavonóides e sua Relação com Efeitos em Preparações Mitocondriais.....	20
1.4 HISPIDULINA.....	22
1.4.1 Atividades Biológicas da Hispidulina.....	24
1.5 EUPAFOLINA.....	29
1.5.1 Atividades Biológicas da Eupafolina.....	30
1.6 EFEITOS DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO E DA MISTURA HISPIDULINA:EUPAFOLINA DE <i>Eupatorium litoralle Cabrera</i> SOBRE O SNC E MUSCULATURA ESQUELÉTICA E LISA NÃO VASCULAR.....	32
1.7 LIBERAÇÃO DE FERRO DA FERRITINA E PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO INDUZIDA POR XENOBIÓTICOS.....	33
2.OBJETIVOS.....	38



<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
3.1 REAGENTES.....	40
3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE HISPIDULINAE EUPAFOLINA.....	40
3.3 ANÁLISES DOS EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE O METABOLISMO MITOCONDRIAL.....	41
3.3.1 Animais.....	41
3.3.2 Isolamento de Mitocôndrias de Fígado de Rato para Determinação do Consumo de Oxigênio e Atividades Enzimáticas e Inchamento Mitocondrial.....	41
3.3.3 Análises Polarográficas para Caracterização da Hispidulina como Agente Inibidor do Transporte de Elétrons.....	42
3.3.4 Preparo da Suspensão de Mitocôndrias Rompidas para a Determinação de Atividades Enzimáticas Mitocondriais.....	43
3.3.5 Determinação da Atividade das Enzimas Relacionada com a Cadeia Respiratória Mitocondrial.....	43
3.3.5.1 NADH Oxidase (NADH: Oxigênio Óxido-redutase).....	43
3.3.5.2 NADH Citocromo c Redutase (NADH: Citocromo c Óxido-Redutase).....	44
3.3.5.3 NADH Desidrogenase (NADH: Ferricianeto Óxido-redutase).....	44
3.3.5.4 Succinato Oxidase (Succinato: Oxigênio Óxido-redutase).....	45
3.3.5.5 Succinato Citocromo c Redutase (Succinato: Ferrocitocromo c Óxido- Redutase).....	46
3.3.5.6 Succinato Desidrogenase (Succinato: Fenazina Metassulfato Óxido-Redutase).....	46
3.3.5.7 Citocromo c Oxidase (Ferrocitocromo c: Oxigênio Óxido-Redutase).....	47
3.3.5.7.1 Obtenção do Ferrocitocromo c.....	47
3.3.6 Determinação da Atividade ATPásica em Mitocôndrias Intactas na Presença e Ausência do Dessacoplador FCCP.....	48
3.3.7 Determinação da ATPásica em Mitocôndrias Rompidas.....	48
3.3.8 Determinação do Inchamento Mitocondrial ( <i>Swelling</i> ).....	49
3.3.8.1 Determinação do Inchamento ( <i>Swelling</i> ) Mitocondrial Sustentado pelo Uso de Substrato Oxidável na Presença de Acetato de Sódio.....	49
3.3.8.2 Determinação do Inchamento ( <i>Swelling</i> ) Mitocondrial Induzido por Valinomicina em Meio Contendo KNO <sub>3</sub> .....	50

3.4 DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE DE LIBERAÇÃO DE FERRO PELA FERRITINA PROMOVIDA PELA HISPIDULINA E EUPAFOLINA E DO POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NESTA LIBERAÇÃO.....	50
3.5 REATIVIDADE ENTRE A HISPIDULINA E O RADICAL LIVRE DIFENILPICRILHIDRAZIL (DPPH).....	51
3.6 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS MITOCONDRIAS.....	51
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS EXPERIMENTAIS.....	51
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
4.1 ANÁLISES POLAROGRÁFICAS PARA CARACTERIZAÇÃO DA HISPIDULINA COMO AGENTE INIBIDOR DO TRANSPORTE DE ELÉTRONS.....	53
4.2 EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE AS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS RELACIONADAS À CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL.....	58
4.3 EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE O COMPLEXO F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPASE.....	62
4.4 EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL.....	66
4.4.1 Efeitos da Hispidulina sobre o Inchamento de Mitocôndrias Energizadas.....	67
4.4.2 Efeitos da Hispidulina sobre o Inchamento de Mitocôndrias Induzido por Valinomicina na Presença de Nitrato de Potássio.....	70
4.6 EFEITOS DA HISPIDULINA E EUPAFOLINA SOBRE A LIBERAÇÃO DE FERRO DA FERRITINA.....	73
4.7 REATIVIDADE ENTRE A HISPIDULINA E O RADICAL LIVRE ESTÁVEL DIFENILPICRILHIDRAZIL (DPPH).....	78
<b>5. DISCUSSÃO FINAL .....</b>	<b>81</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>86</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1A NÚCLEOS BÁSICOS DE FLAVONÓIDES E ALGUNS EXEMPLOS DE SEUS DERIVADOS .....	7
FIGURA 1B NÚCLEOS BÁSICOS DE FLAVONÓIDES E ALGUNS EXEMPLOS DE SEUS DERIVADOS .....	8
FIGURA 2 NUMERAÇÃO DE UM FLAVONÓIDE COM ANEL C (FLAVONA).....	9
FIGURA 3 ESTRUTURA QUÍMICA DA HISPIDULINA.....	22
FIGURA 4 ESTRUTURA QUÍMICA DA EUPAFOLINA.....	29
FIGURA 5 FORMAÇÃO DE SEMIQUINONAS A PARTIR DA OXIDAÇÃO DE DIFENÓIS. ....	35
FIGURA 6 EFEITO DA HISPIDULINA SOBRE A VELOCIDADE RESPIRATÓRIA DO ESTADO III, APÓS A ADIÇÃO DE ADP.....	54
FIGURA 7 EFEITO DA HISPIDULINA SOBRE A VELOCIDADE RESPIRATÓRIA DO ESTADO III NA PRESENÇA DO DESACOPLADOR FCCP.....	57
FIGURA 8 EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE O INCHAMENTO DE MITOCÔNDRIAS ENERGIZADAS NA PRESENÇA ACETATO DE SÓDIO.....	68

FIGURA 9 EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO POR VALINOMICINA, NA PRESENÇA DE NITRATO DE POTÁSSIO, UTILIZANDO MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO DESENERGIZADAS.....	72
FIGURA 10 EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE A LIBERAÇÃO DE FERRO DA FERRITINA.....	76
FIGURA 11 EFEITOS DA EUPAFOLINA SOBRE A LIBERAÇÃO DE FERRO DA FERRITINA.....	76
FIGURA 12 EFEITOS DA EUPAFOLINA SOBRE A LIBERAÇÃO DE FERRO DA FERRITINA NA PRESENÇA DE CATALASE.....	77
FIGURA 13 EFEITO DA HISPIDULINA E EUPAFOLINA SOBRE O RADICAL LIVRE ESTÁVEL DPPH.....	80

## LISTA DE TABELAS E ESQUEMAS

ESQUEMA 1	BIOSSÍNTESE DOS FLAVONÓIDES. CONFLUÊNCIA DAS VIAS BIOSINTÉTICAS DO ÁCIDO CHIQUÍMICO E DOS POLICETÍDEOS.....	5
ESQUEMA 2	SISTEMA REGENERADOR DE ATP.....	49
TABELA 1	EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE OS PARÂMETROS RESPIRATÓRIOS UTILIZANDO GLUTAMATO DE SÓDIO COMO SUBSTRATO OXIDÁVEL.....	28
TABELA 2	EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE OS PARÂMETROS RESPIRATÓRIOS UTILIZANDO SUCCINATO DE POTÁSSIO COMO SUBSTRATO OXIDÁVEL.....	28
TABELA 3	EFEITOS INIBITÓRIOS DA HISPIDULINA SOBRE A VELOCIDADE RESPIRATÓRIA DO ESTADO III, APÓS A ADIÇÃO DE ADP.....	55
TABELA 4	EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE AS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS RELACIONADAS COM A CADEIA RESPIRATÓRIA.....	60
TABELA 5	EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE O COMPLEXO $F_1F_0$ – ATPase DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO.....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\Delta p$	- força próton-motriz
$\Delta\psi$	- potencial elétrico de membrana
A	- absorbância
ABTS (+)	- sal diamônio do ácido 2,2'-azinobis (ácido 6-sulfônico-3-etilbenzotiazolina)
ADP	- adenosina 5' difosfato
ADP/O	- quociente entre nmols de ADP e nanoátomos de oxigênio
AAPH	- 2,2'-azobis(2-amidinopropano)dihidrocloreto
ATP	- adenosina 5' trifosfato
ATPase	- adenosinatrifosfatase
BHT	- butilhidroxitolueno
BSA	- albumina de soro bovino
CAT	- catalase
CCR	- coeficiente de controle respiratório
DCPIP	- 2,6 diclorofenolindofenol
DHRP	- receptor dihidropiridínico
DMSO	- dimetilsulfóxido
DPH	- 1,6 difenil 1,3,5 hexatrieno
DPH-PA	- ácido 3-[p-(6-fenil) 1,3,5 hexatrieno] fenil propiônico
DPPH	- radical 1,1difenil 2 picrilhidrazil
EDTA	- ácido etileno diamino tetracético
EGTA	- ácido etileno glicol bis (éter 2-aminoetil) N, N, N', N' tetracético
ERO	- espécie reativa de oxigênio
FCCP	- carbonil cianeto de p-trifluormetoxifenilhidrazona
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- peróxido de hidrogênio
HEPES	- N-(2-hidroxietil) piperazina N' (ácido 2-etano sulfônico)
Ic <sub>50</sub>	- dose de inibição de crescimento de 50%
I <sub>50</sub>	- dose capaz de provocar 50% de inibição
MDA	- malondialdeído
NAD <sup>+</sup>	- nicotinamida adenina dinucleotídio (oxidada)
NADH	- nicotinamida adenina dinucleotídio (reduzida)
PEP	- fosfoenolpiruvato
Pi	- fosfato inorgânico

PMS	- fenazina metassulfato
RL	- radical livre
SOD	- superóxido dismutase
TCA	- ácido tricloroacético
Tris	- tris (hidrometil) amino metano

## RESUMO

Flavonóides são compostos derivados da benzo- $\gamma$  pirona extraídos de plantas que possuem inúmeros efeitos biológicos. Sua significância terapêutica torna importante a compreensão dos seus mecanismos de ação. Hispidulina (5,7,4'-trihidroxi-6 metóxi-flavona) e eupafolina (5,7,3',4'-tetrahidroxi-6 metóxi-flavona), flavonas naturais que para este estudo foram extraídas das folhas de *Eupatorium litorale*, possuem propriedades antineoplásicas e antioxidantes já demonstradas, porém com mecanismos de ação ainda não descritos. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da hispidulina sobre o metabolismo oxidativo de mitocôndrias de fígado de rato e suas propriedades antioxidantes, a fim de compará-las com a eupafolina. No que diz respeito à respiração mitocondrial, previamente foi demonstrado que a hispidulina ( $0,05\text{--}0,2\text{ mol.l}^{-1}$ ) reduziu a velocidade respiratória no estado III e estimulou-a no estado IV (ROCHA, 2000). As análises dos complexos da cadeia respiratória mostraram que a hispidulina inibe atividades enzimáticas entre os complexos I e III. A atividade da ATPase foi parcialmente inibida pela hispidulina quando foram utilizadas mitocôndrias intactas por congelamento e descongelamento, entretanto, esta flavona fortemente estimulou esta atividade em mitocôndrias intactas e nenhum efeito foi observado na presença de FCCP. A hispidulina foi classificada como um inibidor do transporte de elétrons, podendo atuar também como um desacoplador da fosforilação oxidativa. Nos experimentos de inchamento mitocondrial, na presença de glutamato e acetato de sódio, a hispidulina inibiu este parâmetro acentuadamente, em parte como consequência das inibições enzimáticas sobre a cadeia respiratória, porém a hispidulina parece não interferir com a membrana mitocondrial interna, como indiretamente demonstrado nos ensaios de inchamento mitocondrial na presença de valinomicina e  $\text{KNO}_3$ . No que diz respeito à liberação de ferro da ferritina, tanto a hispidulina quanto a eupafolina estimularam esta liberação em todas as concentrações utilizadas ( $0,05\text{--}0,2\text{ mol.l}^{-1}$ ), porém tal efeito foi mais acentuado para a eupafolina, e revertido pela catalase, o que sugere o envolvimento de  $\text{H}_2\text{O}_2$  neste processo. Em relação às propriedades antioxidantes, a hispidulina foi incapaz de doar elétrons ao radical livre estável DPPH, por outro lado, a eupafolina reagiu com este radical de forma similar ao ácido ascórbico, usado como controle positivo. Os resultados acima sugerem que a inibição dos sistemas enzimáticos mitocondriais pela hispidulina podem ser os responsáveis pela sua citotoxicidade e efeitos biológicos, e que os efeitos antioxidantes da eupafolina podem ser atribuído ao seu anel catecol, permitindo que esta atue como um bom agente redutor.



## ABSTRACT

Flavonoids are plant constituents that have important biological effects. Their potential therapeutic significance makes important an understanding of their action mechanisms. Hispidulin (6-methoxy-5,7,4'-trihydroxyflavone) and eupafolin (6-methoxy-5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone), were extracted from leaves of *Eupatorium litorale*, have recognized antioxidant and antineoplastic properties, although their mechanisms of action have not been described. We now study the effects of hispidulin on the oxidative metabolism of isolated rat liver mitochondria and their antioxidative properties in order to compare it to these of eupafolin. In terms of mitochondrial respiration, it was previously demonstrated that hispidulin (0.05–0.2 mmol.l<sup>-1</sup>) decreases the respiratory rate in state III and stimulated it in state IV (ROCHA, 2000). The enzymatic complexes showed that hispidulin caused a reduction of enzymatic activities between complexes I and III. Activity of ATPase was partially inhibited by hispidulin when mitochondria disrupted by freeze/thawing treatment was used. However, it strongly stimulated this activity in intact mitochondria and no effect was observed in the presence of FCCP. Hispidulin is classified as an electron-transport inhibitor, and as an uncoupler of oxidative phosphorylation. In mitochondrial swelling experiments, in the presence the glutamate and sodium acetate, hispidulin markedly inhibited this parameter, in part as a consequence of inhibition on enzymatic activities of the mitochondrial respiratory chain. However hispidulin seems not to interfere with the inner mitochondrial membrane, as indirectly demonstrated in assays of mitochondrial swelling in the presence of valinomycin and KNO<sub>3</sub>. Both hispidulin and eupafolin release iron from ferritin at all concentrations used (0,05–0,2 mol.l<sup>-1</sup>), but this effect was more accentuated for eupafolin and reversed by catalase, suggesting that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is involved in this process. In terms of antioxidant properties, hispidulin was incapable of donating electrons to the stable free radical DPPH. On the other hand, eupafolin reacted with this radical similarly to ascorbic acid, used as a positive control. The results suggest that the inhibition of mitochondrial enzyme systems by hispidulin may be responsible for its cytotoxicity and biological effects, and that the antioxidant effects of eupafolin may be attributed to its catechol ring, that allows it to be a good reducing agent.

## 1. INTRODUÇÃO

A humanidade tem se utilizado de plantas medicinais há milênios. No início, seu uso era feito empiricamente, e sua eficácia era comprovada através dos resultados obtidos, como a cura ou alívio de moléstias. Desde então, o homem, utilizando a sua inteligência e o poder de observação, acumulou conhecimentos sobre o uso mais apropriado. Através da obtenção de extratos destes vegetais, o homem pôde obter maiores resultados e determinar posologias (FREHSE, 1999).

O estudo de plantas medicinais evoluiu muito nas últimas décadas. Do ponto de vista químico, o desenvolvimento de técnicas cromatográficas e de determinação estrutural facilitaram muito a pesquisa fitoquímica. Do ponto de vista biológico e farmacológico estão surgindo técnicas rápidas de bioensaio para a avaliação dos extratos e produtos isolados (FREHSE, 1999).

Substâncias derivadas de plantas superiores constituem aproximadamente 25% dos medicamentos prescritos (FARNSWORTH *et al.*, 1991). Dentre os compostos encontrados em plantas e que possuem vários efeitos biológicos importantes destacamos os flavonóides. Segundo ARORA (1998), esta é a classe de moléculas mais comum e ativa de ocorrência natural em plantas no que diz respeito a propriedades antioxidantes, sendo capazes de atuar em sistemas hidrofílicos e lipofílicos.

Os flavonóides são compostos polifenólicos de ocorrência natural em frutas, vegetais e bebidas tais como vinho e chá. Pesquisas com populações mediterrâneas têm demonstrado uma possível correlação entre o consumo habitual de azeite de oliva, frutas e vegetais ricos em flavonóides antioxidantes e a baixa taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares dessas populações, apesar de sua alta ingestão de gorduras saturadas (NIJVELDT *et al.*, 2001; TRICHOPOULOU & VASILOPOULOU, 2000).

Segundo HEIM *et al.* (2002), grande parte dos efeitos protetores dos flavonóides em sistemas biológicos podem ser atribuídos às suas habilidades antioxidantes e quelantes de metais. Estas propriedades são importantes pois estão diretamente relacionadas à redução na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e radicais livres (RL) ou ainda ao combate de seus efeitos deletérios, como a oxidação de proteínas celulares, ácidos nucleicos e lipídios (HEIM *et al.*; 2002). Estes mesmos autores a exemplo de outros (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999) enfatizam que as ERO contribuem para o envelhecimento celular, mutagênese, carcinogênese, doenças cardiovasculares, possivelmente através da desestabilização das membranas, oxidação do LDL, danos ao DNA, entre outras. Desta forma os flavonóides, devido às suas propriedades, ganham papel de destaque no estudo do combate aos distúrbios celulares e doenças envolvidas com espécies reativas de oxigênio e radicais livres.

Existem vários relatos na literatura sobre o envolvimento da produção excessiva de radicais livres *in vivo* em várias doenças como artrite reumatóide, doença de Parkinson, esclerose múltipla, aterosclerose, porfirias, alguns tipos de câncer, entre outras (YUTING *et al.*, 1990; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Segundo VAN ACKER *et al.* (1996), os flavonóides interferem tanto nas reações de propagação de radicais livres quanto na formação destes, quelando metais de transição, inibindo enzimas envolvidas na etapa de iniciação, dependendo tais efeitos de suas estruturas químicas. Devido a estas propriedades, este grupo de compostos vêm ganhando espaço cada vez maior no tratamento de inúmeras patologias; inclusive, o efeito terapêutico de medicamentos tradicionais tem sido atribuído à presença de flavonóides (SANZ *et al.*, 1994). Desta forma torna-se importante o estudo dos mecanismos de ação dos flavonóides para melhor entendimento de seus efeitos e avaliação do seu potencial terapêutico.

Segundo HODNICK *et al.* (1996) certos flavonóides são também capazes de inibir algumas enzimas mitocondriais, o que contribui para sua atividade antineoplásica e citotoxicidade podendo, alguns deles, estarem envolvidos em reações de óxido-redução (HODNICK *et al.*; 1986). Uma vez que a cadeia de transporte de

elétrons mitocondrial consiste de uma série de transportadores de elétrons, entre eles a ubiquinona e algumas proteínas integrais de membrana cujos grupos prostéticos são capazes de aceitar ou doar elétrons, sugere-se que os compostos contendo grupamentos capazes de sofrer reações de óxido-redução possam interferir neste transporte (MOINI *et al.*, 1999). Portanto, o estudo dos efeitos do flavonóide hispidulina sobre o metabolismo mitocondrial é relevante.

A hispidulina e a eupafolina, flavonóides objeto de estudo deste trabalho, são encontradas numa variedade grande de espécies vegetais e algumas de suas propriedades, especialmente as atividades antineoplásicas e antioxidantes, já foram parcialmente estudadas (LIU *et al.*, 1985; KUPCHAN, 1969; WOERDENBAG *et al.*, 1995). Entretanto, detalhes dos seus mecanismos de ação permanecem ainda desconhecidos.

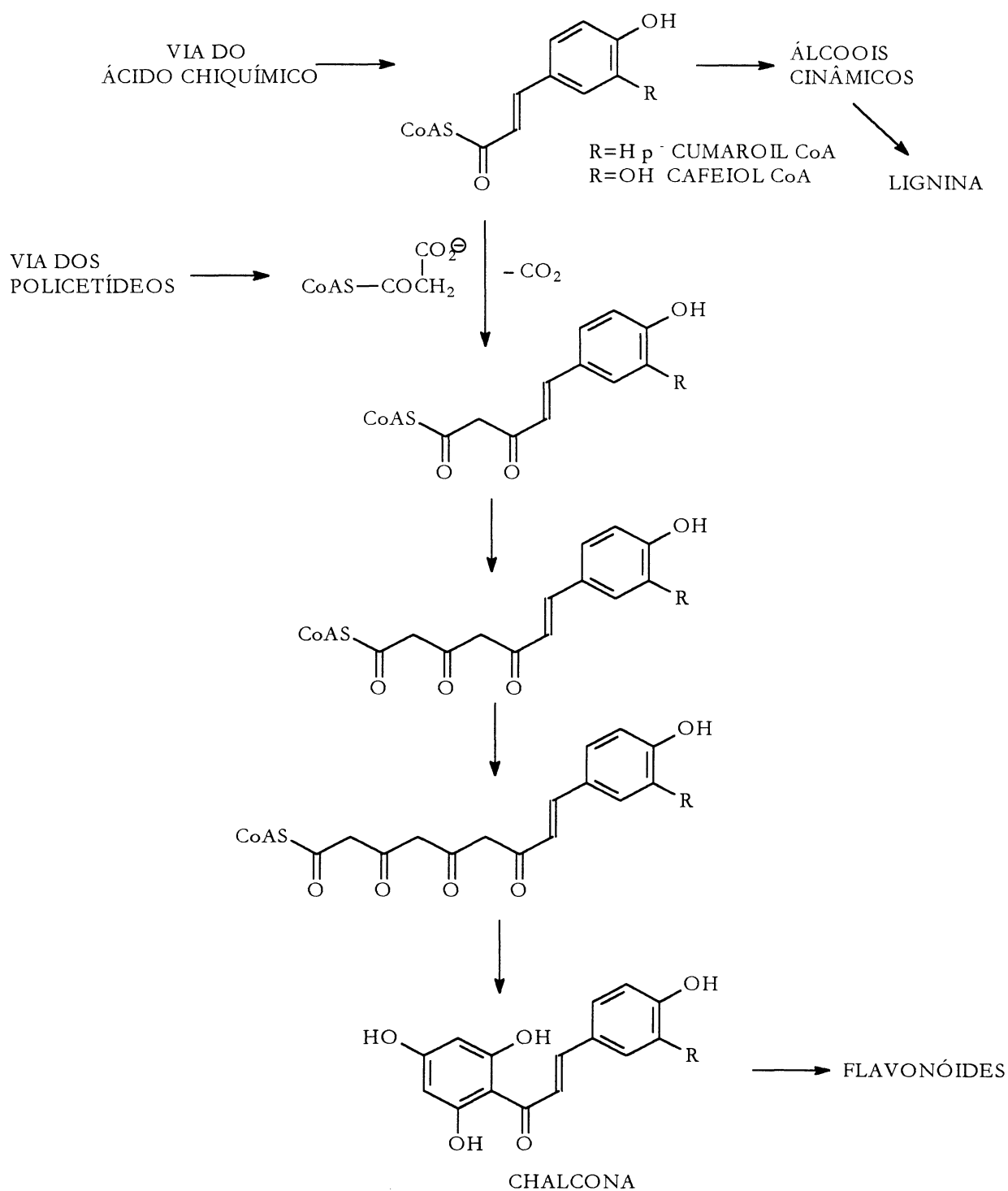
## 1.1. ESTRUTURA E BIOSÍNTESE DOS FLAVONÓIDES

Os flavonóides são uma classe de compostos fenólicos, derivados da benzo- $\gamma$ -pirona, de ocorrência natural, amplamente distribuídos entre as plantas (SANTOS *et al.*; 1998). Cerca de 4000 flavonóides de ocorrência natural já foram descritos e esta lista encontra-se em constante crescimento (MIDDLETON & KANDASWAMI *et al.*, 1994). Como características gerais destes compostos pode-se destacar sua solubilidade em água, e solventes orgânicos como etanol e DMSO, seu caráter fenólico e sua intensa absorção na região ultravioleta e visível do espectro devido à presença de sistemas aromáticos e conjugados (MARKHAM, 1982).

A via biossintética dos compostos flavonoídicos incorpora precursores das vias do ácido chiquímico e dos policetídicos, sendo que o primeiro flavonóide é produzido imediatamente após a confluência das duas vias (Esquema 1) (MARKHAM, 1982; MARCANO & MASAHISA, 1991).

O primeiro flavonóide formado na biossíntese é a chalcona e todas as outras formas são obtidas através de oxidação e redução do esqueleto básico dos flavonóides. Outras modificações podem ocorrer em vários estágios, resultando em: hidroxilação adicional (ou redução); metilação de grupos hidroxila ou do núcleo flavônico; isoprenilação de grupos hidroxila ou do núcleo flavônico; metilenação de grupos diidroxilas em posição orto; dimerização (para produzir biflavonóides); formação de bissulfatos; e a mais importante, glicosilação de grupos hidroxila (para formar flavonóides O-glicosídeos) ou do núcleo flavônico (para formar flavonóides C-glicosídeos) (MARKHAM, 1982; MARCANO & MASAHISA, 1991).

ESQUEMA 1: BIOSÍNTESE DOS FLAVONÓIDES. CONFLUÊNCIA  
DAS VIAS BIOSINTÉTICAS DO ÁCIDO CHIQUÍMICO E  
DOS POLICETÍDEOS.



FONTE: MARKHAM (1982); MARCANO & MASAHISA, (1991).

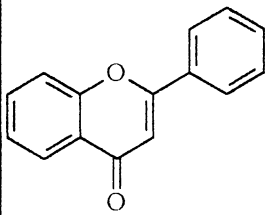
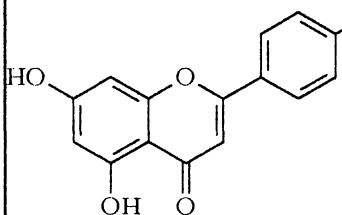
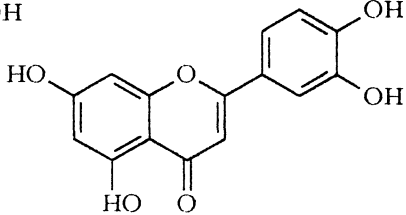
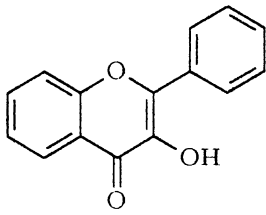
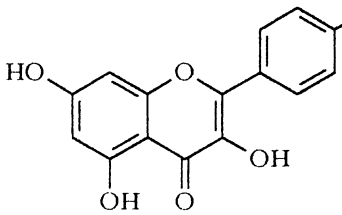
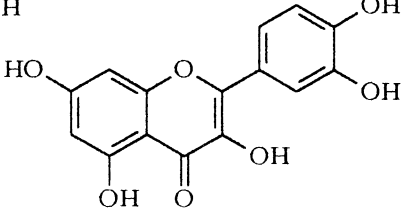
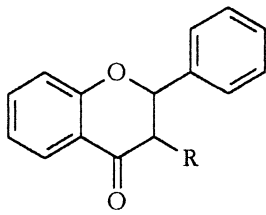
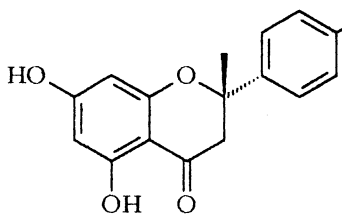
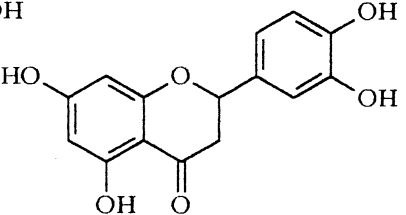
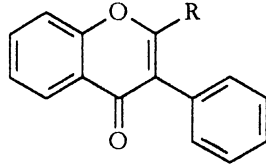
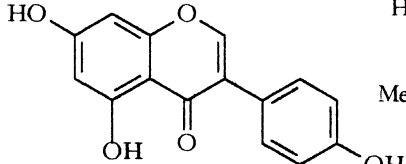
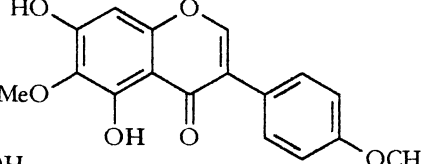
São conhecidas dez classes de flavonóides que possuem o mesmo núcleo básico, a partir dos quais são formados todos os flavonóides, através de outras etapas biossintéticas (MARKHAM, 1982; MARCANO & MASAHISA, 1991). Nas figuras 1A e 1B pode-se verificar os núcleos básicos dos flavonóides e alguns exemplos dos seus derivados.

Os flavonóides da dieta diferem no arranjo dos grupos hidroxila e metóxi, quanto à glicosilação e em relação à conjugação dos anéis A e B (HEIM *et al.*; 2002). Durante o metabolismo, grupos hidroxila são adicionados, sulfatados ou glucuronizados. Em alimentos, os flavonóides existem primariamente como *O*-glicosídeos e polímeros (HAMMERSTONE *et al.*; 2000).

A hispidulina e a eupafolina, que foram estudadas neste trabalho pertencem à classe das flavonas. WOLLENWEBER & DIETZ (1981), demonstraram que flavonas e flavonóis das ceras foliares e exudatos dos vegetais quase sempre ocorrem na forma livre, sem glicosilação, e geralmente metilados.

As agliconas (flavonóides não ligados à carboidratos) contém quinze átomos de carbono em seu núcleo básico e estes estão arrançados em unidades C-6-C-3-C-6, ou seja, dois anéis aromáticos ligados através de uma unidade de três carbonos que podem ou não formar um terceiro anel (Figura 2). Biossinteticamente o anel A é derivado de uma cadeia policetídica, o anel B é derivado do ácido chiquímico e os três átomos de carbono que unem os anéis A e B, provém da parte alquílica do fenilpropano (esqueleto carbônico oriundo do ácido chiquímico) (MARKHAM, 1982; MARCANO & MASAHISA, 1991). A numeração dos carbonos do esqueleto carbônico dos compostos flavonoídicos é feita por um sistema numérico que utiliza numerais ordinários para os anéis A e C e numerais seguidos de apóstrofo para o anel B (Figura 2) (BRAVO, 1998).

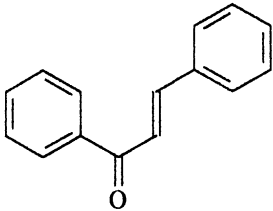
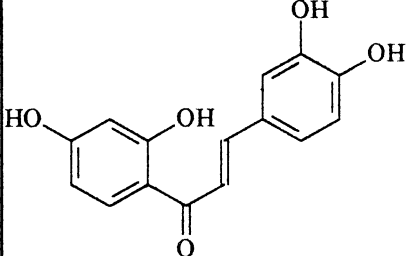
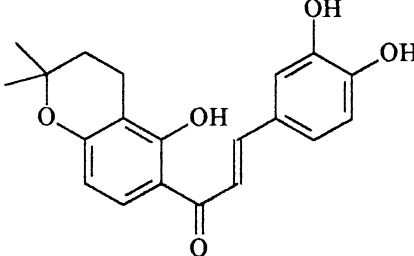
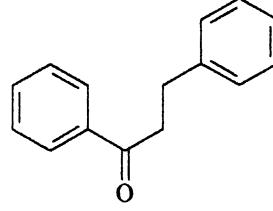
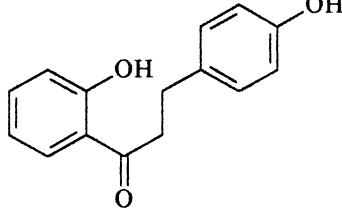
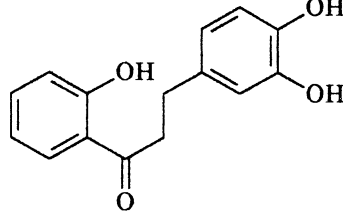
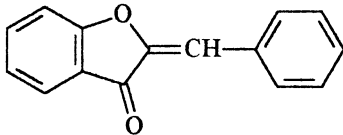
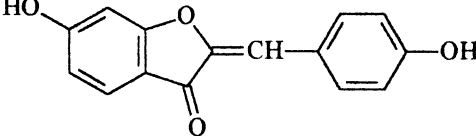
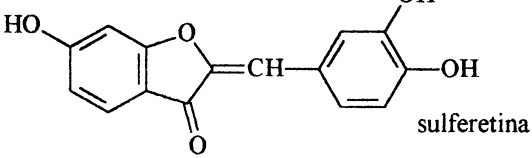
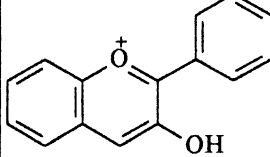
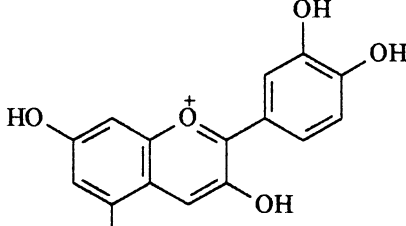
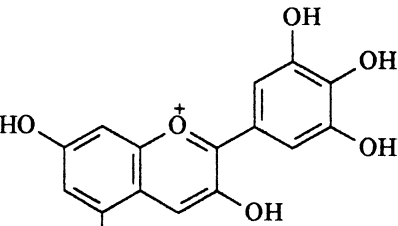
FIGURA 1A: NÚCLEOS BÁSICOS DE FLAVONÓIDES E ALGUNS  
EXEMPLOS DE SEUS DERIVADOS

Núcleos Básicos	Alguns exemplos
 <p>flavona</p>	 <p>apigenina</p>  <p>luteolina</p>
 <p>flavonol</p>	 <p>kaempferol</p>  <p>quercetina</p>
 <p>R=H flavanona R=OH flavanonol</p>	 <p>naringenina</p>  <p>hesperetina</p>
 <p>R=H isoflavona R=OH isoflavonol</p>	 <p>genisteína</p>  <p>irisolidona</p>

FONTE: MARKHAM (1982); MARCANO & MASAHAISA, (1991).

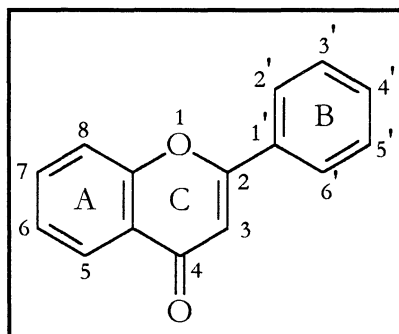


FIGURA 1B: NÚCLEOS BÁSICOS DE FLAVONÓIDES E ALGUNS EXEMPLOS DE SEUS DERIVADOS

Núcleos Básicos	Alguns exemplos
 chalcona	 buteína  3,4—diidroxilnchocarpina
 diidrochalcona	 2', 4—diidroxi —diidrochalcona  2', 3, 4—triidroxi—diidrochalcona
 aurona	 hispidiol  sulferetina
 antocianidina	 cianidina  delphinidina

FONTE: MARKHAM (1982); MARCANO & MASAHISA, (1991).

FIGURA 2: NUMERAÇÃO DE UM FLAVONÓIDE COM ANEL C (FLAVONA)



FONTE: BRAVO, (1998).

Devido à sua significância terapêutica, o número de flavonóides identificados está aumentando rapidamente e a busca extensiva de suas ações tem sido realizada por muitos laboratórios. Os resultados destes estudos têm mostrado que compostos pertencentes à classe dos flavonóides possuem um amplo espectro de efeitos fisiológicos e farmacológicos e que serão melhor descritos a seguir (ABDALLA *et al.*, 1988).

## 1.2. EFEITOS BIOLÓGICOS DOS FLAVONÓIDES

Nas últimas décadas foram descritas várias atividades biológicas importantes dos flavonóides, sendo que recentemente ocorreu aumento no interesse em investigar várias propriedades farmacológicas positivas destes compostos (ARORA *et al.*; 1998).

Existem vários relatos sobre efeitos benéficos da ingestão de alimentos ou bebidas ricos em flavonóides polifenólicos em humanos. Entre os relatos mais recentes pode-se citar a reversão da disfunção endotelial vasomotora em pacientes com doença arterial coronariana após consumo agudo e crônico de chá preto (DUFFY *et al.*, 2001). Quando humanos tiveram suas dietas suplementadas diariamente com 22 g de pó de cacau e 16 g de chocolate preto, observou-se a) redução da suscetibilidade de oxidação do LDL, b) aumento nas concentrações de HDL, c) aumento na capacidade antioxidante total do soro (WAN *et al.*, 2001); d) redução na agregação plaquetária por alteração da síntese de eicosanóides (SCHRAMM *et al.*, 2001) e ainda e) redução no índice de infarto do miocárdio e da mortalidade por doença coronariana em mulheres idosas após dieta rica em flavonóides (HERTOG *et al.*; 1993).

Entre as inúmeras atividades biológicas atribuídas aos flavonóides, pode-se citar: a) antiinflamatória (MIDDLETON, 1984; HAVSTEEN, 1983); b) antialérgica (MIDDLETON, 1984; HAVSTEEN, 1983); c) antiviral (MIDDLETON, 1984; HAVSTEEN, 1983); d) atividade catecolamínica (KUHNAU, 1976); e) inibidora da síntese do DNA em células tumorais (YUTING *et al.*, 1990); f) cardioprotetora, por redução da injúria causada pela produção de oxidantes pró-inflamatórios (BISNACK *et al.*, 2001) e por atenuação da oxidação de LDL e desenvolvimento de aterosclerose (FURHMAN & AVIRAM, 2001); g) antihipertensiva (DUARTE *et al.*, 2001); h) anticarcinogênica contra vários tipos de tumores (YANG *et al.*, 2001; WEYANT *et al.*, 2001; ELLATAR & VIRJI, 2000); i) redutora de lipoperoxidação (VALENZUELA *et al.*, 1985, 1986; TOREL *et al.*, 1986; FRAGA *et al.*, 1987; LARSON, 1988; FAURÉ *et al.*, 1990; MORA *et al.*, 1990; YUTING *et al.*, 1990; CHOLBI *et al.*, 1991; COTELLE *et al.*, 1992; RIOS *et al.*, 1992; MIYAHARA *et al.*,

1993; RATTY & DAS, 1988; AREIAS *et al.*, 2001), i) redutora da hepatotoxicidade induzida por xenobióticos em animais (FERRÁNDIZ *et al.*, 1994), entre outras.

Grande parte dos efeitos biológicos protetores dos flavonóides podem ser atribuídos às suas habilidades antioxidantes (HEIM *et al.*;2002). Vários autores têm descrito esta capacidade para moléculas de flavonóides com diferentes estruturas químicas.

ARORA *et al.* (1998) avaliaram a habilidade de vários flavonóides, entre eles alguns bastante estudados como a luteolina (5,7,3'4' tetrahidroxiflavona) e rutina (5,7,3'4'-tetrahidroxi 3-rutinese-flavona), pertencentes à classe das flavonas e quercetina (5,7,3'4'-pentahidroxi-3-flavonol), pertencente à classe dos flavonóis, quanto à sua habilidade de inibir a peroxidação lipídica induzida por FeCl<sub>2</sub> e FeCl<sub>3</sub>, bem como de seqüestrar o radical peroxil gerado por AAPH em sistema de membrana liposomal, usando sondas fluorescentes para a porção mais hidrofílica da membrana (DPH-PA). A eficácia antioxidante dos compostos foi observada pela redução na intensidade de decaimento da fluorescência emitida pela sonda, causada pelos radicais livres gerados durante a peroxidação lipídica. Os flavonóides testados se mostraram mais eficientes na proteção da lipoperoxidação induzida por metais (FeCl<sub>2</sub> ou FeCl<sub>3</sub>) do que na gerada pelos radicais peroxil produzidos pelo AAPH, os autores sugerem que isto se deva à dificuldade de acesso dos flavonóides à região da membrana onde os radicais livres são gerados por este último agente, pois segundo SANTOS *et al.* (1998), o efeito protetor contra lipoperoxidação parece depender tanto da estrutura do composto, quanto da capacidade de interação e penetração na bicamada lipídica das membranas. TOREL *et al.* (1986) relataram que os flavonóides também são capazes de reagir com radicais peroxil, envolvidos na reações de terminação durante a autooxidação de ácidos graxos poliinsaturados.

ROBAK & GRYGLEWSKI (1987) demonstraram também que vários flavonóides, entre eles a quercetina e a rutina, exercem seus efeitos antioxidantes seqüestrando ânions superóxido gerados enzimaticamente através do sistema xantina-

xantina oxidase ou não enzimaticamente em sistema fenazina metassulfato, observando-se a redução do tetrazólio.

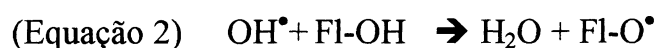
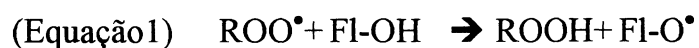
Embora haja grande ênfase nos efeitos antioxidantes dos flavonóides, PUPPO (1992) alerta que dependendo da estrutura da molécula e dos agentes quelantes utilizados nos sistemas de reação, estas moléculas podem atuar como pró-oxidantes, demonstrando assim efeitos deletérios.

A luteolina tem sido usada como agente indutor de apoptose (YAMASHITA & KAWANISHI, 2000). Alguns flavonóides podem tornar-se mutagênicos, devido à sua semelhança estrutural com os nucleosídeos que podem levar à intercalação do sistema benzopirona dos flavonóides entre as bases que compõem o DNA. Entretanto, verificou-se que os efeitos colaterais não são muito graves desde que o uso seja em doses moderadas, ou seja, <1g/dia/paciente adulto (HAVSTEEN, 1983).

Além dos efeitos danosos já descritos, segundo HODNICK *et al.*, (1986), os flavonóides inibem algumas enzimas como fosfodiesterases, aldose redutase, bem como as enzimas mitocondriais NADH oxidase, succinato oxidase e ATPases o que contribui para sua citotoxicidade e atividade antineoplásica. A inibição da succinato oxidase por certos compostos, como a mirecitina (3,5,7,3',4'5'-OH flavonol), quercetagenina (3,5,6,7,3',4'-OH 6-OMe flavonol) entre outros, parece também estar ligada à habilidade dos compostos fenólicos de participarem de reações de óxido-redução, ou ainda de se autooxidarem gerando espécies reativas de oxigênio (HODNICK *et al.*, 1986). De acordo com estudos feitos relacionando a estrutura destes compostos com suas atividades biológicas, os inibidores mais potentes da succinato oxidase possuem configuração do grupo hidroxila capaz de suportar reações de óxido-redução, como por exemplo as encontradas em grupos hidroquinona e catecol (HODNICK *et al.*, 1987).

Desta forma, quanto aos efeitos dos flavonóides em sistemas biológicos em geral, pode-se dizer que são devido à: a) sua capacidade de reagir com os radicais livres, seqüestrando-os e transformando-os em espécies menos reativas como o radical fenoxil do flavonóide (equações 1 e 2) (ARORA, 1998) ou ainda b) sua capacidade de transferir elétrons a radicais livres, agindo como agentes redutores; c) sua capacidade de quelar metais de transição, envolvidos com a produção de radicais livres; d) sua afinidade de ligação a polímeros biológicos e e) sua habilidade de afetar o transporte de elétrons, participando de reações de óxido-redução (HAVSTEEN, 1983; ARORA *et al.*, 1998; HODNICK *et al.*, 1988; HEIM *et al.*, 2002).

#### FORMAÇÃO DE RADICAL FENOXIL DO FLAVONÓIDE



FONTE: ARORA, 1998.

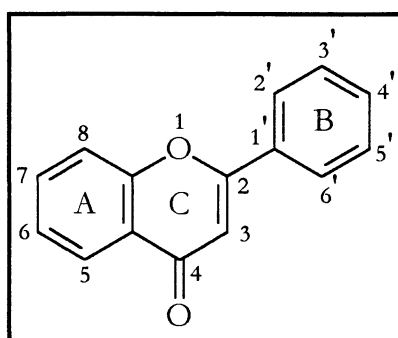
É importante destacar que, quando uma molécula de flavonóide reage com um radical livre, um outro radical se forma, que é o radical fenoxil do flavonóide. Se este radical fosse bastante reativo, a cascata de efeitos deletérios continuaria sendo propagada, entretanto esta espécie radical formada é bastante estável, não reagindo rapidamente com outras moléculas, assim, o flavonóide exerce seu efeito antioxidante (HOLLMAN *et al.*; 1996). Existem várias características estruturais das moléculas de flavonóides já estudadas que podem favorecer a estabilidade do radical fenoxil, como será discutido a seguir, além de outras que influenciam sobre suas demais propriedades.

### 1.3 CORRELAÇÃO ENTRE ATIVIDADE BIOLÓGICA E ESTRUTURA DOS FLAVONÓIDES

A atividade antioxidante dos flavonóides e seus metabólitos *in vitro* dependem do arranjo dos grupos funcionais em torno do núcleo básico. Nos últimos quinze anos, estudos de estrutura-atividade têm gerado várias linhas de evidências que definem os requisitos estruturais necessários à capacidade seqüestradora de radicais livres, atividade quelante e antioxidante (HEIM *et al.*; 2002). Apesar de haverem idéias controversas, em alguns casos, parece haver consenso de que alguns aspectos estruturais são requisitos necessários para determinados efeitos biológicos.

Para melhor acompanhar a discussão sobre os aspectos relativos à correlação estrutura-atividade biológica dos flavonóides, a figura da estrutura básica destes compostos foi novamente inserida.

FIGURA 2 NUMERAÇÃO DE UM FLAVONÓIDE COM ANEL C (FLAVONA)



FONTE: BRAVO (1998).

ARORA *et al.* (1998) que estudaram diversos flavonóides quanto à sua capacidade antioxidante, sugerem que as diferenças entre as atividades antioxidantes destes flavonóides se devem: a) diferentes padrões de hidroxilação no anel B (figura 2); b) duplas ligações entre C-2 e C-3, e grupo ceto em C-4. Os autores salientaram ainda que a presença de grupos metóxi atenuam os efeitos antioxidantes destes compostos e que existiria a necessidade de grupos hidroxila no anel A, além daquelas do anel B, para que os compostos pudessem exercer esta atividade. A hispidulina (5, 7,

4' trihidroxi-6 metóxi flavona) e a eupafolina (5, 7, 3',4' tetrahidroxi-6 metóxi flavona) flavonas objeto de estudo deste trabalho, possuem também algumas destas características estruturais. Cada um destes critérios estruturais será discutido em maiores detalhes a seguir.

### 1.3.1 Grupamentos Hidroxila

Em termos de atividade antioxidante, o número e o arranjo espacial dos substituintes hidroxila são fatores até mais importantes do que o núcleo básico de cada classe de flavonóide (HEIM *et al.*, 2002; CAO *et al.*, 1997; OKAWA *et al.*, 2001). Quanto a este aspecto, o padrão de hidroxilação no anel B parece ser importante na atividade seqüestradora tanto de espécies reativas de oxigênio quanto de nitrogênio (BURDA & OLESZEK, 2001; HAENEN *et al.*; 1997). Os grupamentos hidroxila do anel B podem doar um átomo de hidrogênio aos radicais hidroxil, peroxil e peroxinitrito, estabilizando-os e formando os radicais flavonóides fenoxil, que são mais estáveis, conforme anteriormente indicado nas equações 1 e 2. Têm-se observado que esta capacidade de reagir com radicais livres é diretamente proporcional ao número de grupamentos hidroxila no anel B (CAO *et al.*; 1997).

Entre as posições das substituições no anel B, as hidroxilas nas posições 3' e 4' formando o anel catecol, são apontadas como necessárias para os efeitos observados em diversas classes de flavonóides (MORA *et al.*; 1990) uma vez que conferem maior grau de estabilidade aos radicais fenoxil dos flavonóides devido à participação na deslocalização de elétrons, sendo fator determinante do potencial de atividade antioxidante (ARORA *et al.*; 1998). A oxidação de um flavonóide ocorre quando no anel B a estrutura catecol está presente (van ACKER *et al.*; 1996) gerando um radical *o*-semiquinona bastante estável, através de uma facilitada delocalização de elétrons, sendo fator determinante do potencial de atividade antioxidante (ARORA *et al.*; 1998).



Em concordância com as afirmações anteriormente citadas, MIURA *et al.* (2002) observaram, através de diferentes métodos de avaliação da capacidade antioxidante, que a luteolina, *o*-metil-luteolina e eupafolina, todas possuindo grupamentos *o*-dihidroxi no anel B (anel catecol), exibem atividades antioxidantes comparáveis às daquelas dos conhecidos agentes redutores BHT, ácido ascórbico e  $\alpha$ -tocoferol. Ainda, van ACKER *et al.* (1996) observaram que a habilidade da luteolina (5,7,3',4'-OH) em seqüestrar o radical peroxil é muito superior à do kaempferol (3,5,7,4'-OH), as quais possuem o mesmo número de grupos hidroxila, mas no kaempferol o anel catecol está ausente.

PANALLA *et al.* (2001) ao avaliarem a cinética da capacidade seqüestradora de ABTS(+) (modelo cátion radical estável) por flavonóides, verificaram também que compostos com estrutura catecol apresentaram maior atividade que os monofenóis, enquanto os flavonóides não substituídos neste anel não reagiram.

Outro critério estrutural apontado como importante no que diz respeito à hidroxilação é a presença de substituições na posição 3 do anel C, que pode estar aberto ou fechado; as chalconas, que possuem o heterociclo aberto e são consideradas antioxidantes ativas (HEIM *et al.*, 2002). Independente de estar aberto ou fechado (HEIM *et al.*, 2002), o anel C é bastante importante na molécula, pois além de permitir a conjugação entre os anéis A e B, a presença da OH em C-3, aliada à presença do grupo 3'4'catecol potencializa muito o efeito antioxidante da molécula (HAENEN *et al.*; 1997). Flavonóides que possuem duplas ligações entre C-2 e C-3 e grupamento OH livre nestas posições são moléculas planares, enquanto que as moléculas onde este grupo é ausente são fracamente torcidas e sua atividade seqüestradora de radicais livres é comprometida. Fato porque a planaridade permite conjugação, distribuição de elétrons e conseqüentemente aumenta a estabilização do radical fenoxil do flavonóide (BORS *et al.*; 1990). Acredita-se ainda, que os grupamentos hidroxila do anel B formem ligações de hidrogênio com a hidroxila em posição 3 do anel C, alinhando os anéis A, B e C. Eliminando-se estas pontes de hidrogênio a molécula reduz seu ângulo

de torção no anel B, comprometendo a capacidade de delocalização dos elétrons (RICE-EVANS *et al.*; 1996; van ACKER *et al.*; 1996).

A capacidade aumentada da quercetina em inibir danos oxidativos causados ou não por metais é em parte atribuída a sua substituição 3-OH (RATTY & DAS, 1988; ARORA *et al.*, 1998). A substituição da hidroxila nesta posição por um grupamento metil ou glicosil é capaz de abolir completamente a atividade da quercetina e kaempferol em relação à inibição da oxidação do ácido linoléico (BURDA & OLESZEK, 2001).

Embora a grande parte dos estudos relacionando a estrutura com a atividade dos flavonóides apontem a necessidade do grupo catecol no anel B e de hidroxila em C-3 no anel C para boa atividade antioxidante, em alguns deles ao lado destas características estruturais, é destacada a importância de hidroxilas em outras posições e em outros anéis.

YUTING *et al.* (1990), verificaram que rutina e quercetina (que também possuem anel catecol), foram as mais efetivas seqüestradoras de ânions superóxido, entretanto neste mesmo estudo os compostos flavonóides mais potentes inibidores da lipoperoxidação avaliada pelo método do ácido tiobarbitúrico, apresentavam dois grupos fenóis com hidroxilas em outras posições, entre eles a hispidulina (OH em posição 4' no anel B e 5 e 7 no anel A) e a morina, que possui hidroxila nas posições 2' e 4' no anel B.

Verificou-se boa correlação entre a capacidade de seqüestrar peroxinitrito e presença do grupo catecol no anel B (HAENEN *et al.*, 1997), observados nos flavonóis quercetina, rutina e monohidroxiethylrutósideo, entretanto, a presença de três grupos hidroxila nos anéis A e C, nas posições 3, 5 e 7 observados na galanina, trihidroxiethyl e quercetina surtiram efeitos semelhantes (HEIJNEN *et al.*; 2001). DAS & DEREIRA (1990) propõem que o grupo hidroxila nas posições 3 e 7 contribuem para atividade antioxidante aumentada em relação à localização deste grupo nas posições 5 ou 8.

COTELLE *et al.* (1996) sugerem ainda que compostos 7 hidroxiflavonas são potentes inibidores da xantina oxidase, que está implicada na geração de espécies reativas de oxigênio.

Embora no estudo de COTELLE *et al.* (1992) a estrutura pirogalol da mirecitina, que possui grupos hidroxila nas posições 3',4' e 5' no anel B, tenha favorecido a atividade seqüestradora de radicais livres, os próprios autores apontam que esta estrutura é usada para formar ânions superóxido. Portanto, compostos flavonóides com estrutura pirogalol são propensos a serem bons pró-oxidantes (van ACKER *et al.*, 1996).

#### 1.3.2 Duplas Ligações entre C-2 e C-3 e Grupo Ceto em C-4

Estas características estruturais estão presentes em apenas algumas classes de flavonóides, entretanto, as flavonas à qual pertencem a hispidulina e eupafolina, possuem tanto a dupla ligação entre C-2 e C-3, quanto o grupo ceto em C-4.

Em relação à presença de duplas ligações entre C-2 e C-3, acredita-se que a saturação desta ligação reduza a capacidade antioxidante da molécula (ARORA *et al.*, 1998; BORS *et al.*, 1990). RAPTA *et al.* (1995), ao estudarem as propriedades redox de vários flavonóides presentes no própolis, concluíram que os potenciais de oxidação destes compostos foram bastante influenciados pela presença da dupla ligação entre C-2 e C-3. BURDA & OLESZEK (2001), encontraram boa correlação entre a presença de duplas ligações entre C-2 e C-3 e atividade antioxidante, verificada através de reatividade com solução de DPPH.

van ACKER *et al.*, (1996) verificaram que a quercetina mostrou-se extremamente ativa como seqüestradora de radicais livres, efeito atribuído à combinação de estrutura catecol com dupla ligação entre C-2 e C-3. Além disso, estudos comparativos quanto à capacidade de inibir a lipoperoxidação não enzimática em mitocôndrias de cérebro de

rato entre a taxifolina (3,5,7,3',4'-OH flavonona) e a quercetina, que possuem idêntico padrão de hidroxilação nos anéis A, B e C, mostraram que se os outros requisitos estruturais estão totalmente preenchidos, as duplas ligações entre C-2 e C-3 distinguem o melhor antioxidante, pois em tais estudos a quercetina, que também possui este requisito estrutural, sempre se mostrou mais ativa em relação à taxifolina, que não o possui (RATTY & DAS; 1988). Neste mesmo estudo, RATTY & DAS (1988), observaram que além dos critérios estruturais anteriormente discutidos, o grupo ceto em C-4 estava presente nas moléculas mais efetivas contra a lipoperoxidação.

É importante ressaltar que apesar da quercetina apresentar grande capacidade de sequestrar radicais livres, como mencionado anteriormente, este flavonol também possui efeitos carcinogênicos, sendo capaz de danificar o DNA via produção de  $H_2O_2$  resultando em apoptose ou mutações (YAMASHITA & KAWANISHI, 2000) e de inibir enzimas da cadeia respiratória (HODNICK *et al.*; 1987).

### 1.3.3 Grupamentos Metoxila

As diferenças na atividade antioxidante entre flavonóides polihidroxilados e polimetoxilados são devido às diferenças na hidrofobicidade e planaridade da molécula (HEIM *et al.*; 2002). Neste sentido, substituições de hidroxilas por grupos metoxil no anel B são particularmente importantes na interferência sobre a atividade antioxidante, especialmente quando obstruem a formação do anel catecol, pois a troca de substituintes 6'-OH/4'-OMe por 6'-MeO/4'-OH é capaz de extinguir completamente a reatividade de moléculas com o DPPH (MATHIESEN *et al.*; 1997).

Metoxilas múltiplas no anel A também são capazes de reverter o efeito positivo da estrutura catecol no anel B, como a inibição da formação dos produtos do malondialdeído (MDA) que não ocorre com flavonóides que possuem dois ou três grupamentos O-Me no anel A (MORA *et al.*; 1990).

Entretanto, ABDALLA *et al.* (1988) salienta que metilações múltiplas nas hidroxilas em sustentação à boa atividade protetora contra lipoperoxidação, reduzem o efeito dos flavonóides na respiração mitocondrial, consequentemente aumentando o potencial farmacológico destes compostos contra processos patológicos relacionados ao estresse oxidativo.

Destaca-se portanto, que a hispidulina, o flavonóide que é objeto de estudo neste trabalho possui: a) dupla ligações entre C-2 e C-3, b) grupo ceto em C-4 e c) hidroxila 4' no anel B e em posições 5 e 7 no anel A e d) um único grupamento metóxi em C-6 no anel A, tornando importante o estudo de sua capacidade de estar envolvida em reações de óxido-redução e ainda de promover inibições enzimáticas envolvidas com a cadeia respiratória mitocondrial, como será observado a seguir. A eupafolina, flavonóide que foi utilizado em parte deste estudo a título de comparação com os efeitos antioxidantes da hispidulina, além das características estruturais acima apontadas, ainda possui o anel catecol (hidroxilas nas posições 3' e 4' no anel B), item de unânime importância quando se trata de efeitos biológicos e antioxidantes.

Correlações entre estrutura química e atividade também têm sido estabelecidas para estudos com mitocôndrias, e muitos dos requisitos estruturais anteriormente descritos para atividade sequestradora de radicais livres também são necessários para interferência sobre parâmetros respiratórios relacionados a este modelo experimental, como será descrito a seguir.

#### 1.3.4 Características Estruturais dos Flavonóides e sua Relação com Efeitos em Preparações Mitocondriais

No que diz respeito ao número e posição dos grupamentos hidroxila dos flavonóides, coloca-se a importância de substituições polihidroxila nos anéis A e B, sendo necessária a presença de pelo menos 3 grupos hidroxila livres para inibição *in vitro* da lipoperoxidação não enzimática (RATTY & DAS, 1988). Contudo, SANTOS

*et al.* (1998) destacam que mais do que dois grupos hidroxila podem reduzir a natureza lipofílica das moléculas, afetando sua propriedade molecular associada com o desacoplamento da respiração mitocondrial. COLEMAN *et al.*, (1984) sugerem que o grupo hidroxila na posição 3' é necessário para inibição da velocidade respiratória no estado III, substituição observada como importante também para inibição das atividades da NADH oxidase de mitocôndria de coração de rato e succinato oxidase de mitocôndria de fígado de rato (HODNICK *et al.*, 1987; BOHMONT *et al.*, 1987), além de substituições em posições 3', 4' e 5' no anel B, formando estruturas pirogalol ou catecol (BOHMONT *et al.*; 1987). SANTOS *et al.* (1998), sugerem que para o efeito desacoplador da respiração e sobre a síntese de ATP parecem ser necessárias substituições OH nas posições 5 e 7, como no caso da pinocembrina e 3-*o*-acil-pinobacina, substituições que para estes autores podem conferir poder de remoção de elétrons, já RAVANEL (1986), observou que hidroxilas nas posições 7 e 4' foram necessárias à boa atividade desacopladora em mitocôndrias de vegetais.

Também tem sido apontada a importância da dupla ligação entre C-2 e C-3, para inibição das enzimas mitocondriais NADH oxidase e succinato oxidase (HODNICK *et al.*, 1987; BOHMONT *et al.*, 1987), bem como para potente inibição *in vitro* da peroxidação lipídica não enzimática em mitocôndrias de cérebro de rato (RATTY & DAS, 1988).

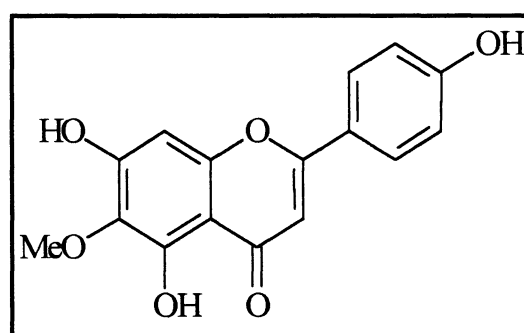
O grupo ceto em C-4 estava presente nas moléculas inibidoras das atividades enzimáticas da NADH oxidase e succinato oxidase mitocondriais (HODNICK *et al.*; 1987) e inibidoras da lipoperoxidação (RATTY & DAS, 1988).

Além disso, a efetividade da proteção dos flavonóides contra lipoperoxidação parece depender da presença de grupamentos hidroquinona nos anéis A ou B e características de hidrofobicidade da molécula (MIYAHARA *et al.*, 1993), o que interfere na sua orientação nas biomembranas, e consequentemente nos coeficientes de partição na fase lipídica (SANTOS *et al.*, 1988).

## 1.4 HISPIDULINA

A hispidulina (5, 7, 4'-trihidroxi-6metóxiavona) (figura 3), também denominada de dinatina, pertence à classe das flavonas (núcleo básico na figura 1A) sendo um flavonóide encontrado em muitas plantas, podendo-se citar: *Digitalis lanata* (DOHERTY *et al.*; 1963), que segundo HAZEKAMP *et al.* (2001) é planta da qual consta o primeiro relato de isolamento da hispidulina; *Chenopodium botrys* (DEPASCUAL *et al.*, 1981) da família *Chenopodiaceae*; da família *Verbenaceae*, *Clerodendrum indicum* L. (SANZ *et al.*, 1994), *Clerodendrum petasites* (HAZEKAMP *et al.*, 2001) e *Lippia citriodora* (Lemon verbena) (VALENTÃO *et al.*; 1999), cujas folhas são usadas industrialmente como aromatizante de bebidas ou na medicina popular como infusos para fins antiespasmódicos, antipiréticos e para distúrbios gástricos; *Salvia plebeia* (WENG *et al.*, 1998) da família *Labiataceae*; *Millingtonia hortensis* L. (CHULASIRI, *et al.*, 1992) da família *Bignoniaceae*; *Eriodictyon californicum* (LIU *et al.*, 1992) da família *Hydrophyllaceae*; *Iris pseudacorus* (HANAWA *et al.*, 1991) da família *Iridaceae*; entre outras.

FIGURA 3: ESTRUTURA QUÍMICA DA HISPIDULINA



FONTE: FREHSE, 1999.

Para este estudo, a hispidulina foi extraída das folhas da planta *Eupatorium littorale* Cabrera (FREHSE, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2001). O gênero *Eupatorium* pertence à família *Asteraceae* (HARBORNE, 1967). Esta família consiste de mais de 1.100 gêneros e possivelmente mais de 20.000 espécies, de distribuição cosmopolita, melhor representado em regiões temperadas ou subtropicais. Devido ao grande número de espécies deste gênero e sua importância quanto à presença de metabólitos especiais de várias classes, principalmente lactonas sesquiterpênicas e flavonóides, várias publicações envolvendo estas plantas estão disponíveis (CRONQUIST, 1981). Dentre as plantas que fazem parte desta família, em várias delas foi encontrada a hispidulina, podendo-se citar: *Geigeria aspera* (COLEMAN *et al.*, 1984); *Arnica montana* L. (BOURDILLAT *et al.*, 1988); *Balduina angustifolia* (LEE *et al.*, 1972); *Saussurea stella* (YUTING *et al.*, 1990); *Achillea ageratum* (VIEIRA *et al.*, 1999); *Tithonia diversifolia* (PEREIRA *et al.*, 1997); *Picnomon acarna*; (LASKARIS *et al.*, 1995); *Centaurea nervosa* e *Centaurea phrygia* (CHRISTENSEN & LAM, 1991); *Ratibida latipalearis* (ROJAS *et al.*, 1991); *Baccharis gaudichadiana* (FULLAS. *et al.*, 1994); *Baccharis magellanica* (CORDANO *et al.*, 1982); *Baccharis trimera* (SOICKE *et al.*, 1987; NAGASUGI, 1998), conhecida popularmente no Brasil como carqueja, sendo suas folhas bastante usadas em infusões com uso medicinal para problemas renais e hepáticos, entre outros. A espécie *Eupatorium littorale*, da qual foi extraída a hispidulina para este estudo, é uma planta nativa de crescimento espontâneo da região do município de Piraquara-PR, próximo à Serra do Mar, sendo um arbusto ramoso de um metro de altura com talos arredondados, aveludado, pubescente e densamente folhados até a inflorescência (CABRERA, 1959). Várias espécies de *Eupatorium* constavam da lista dos 59 remédios utilizados pelos índios norte-americanos na época da colonização (HARBONE *et al.*; 1967).



#### 1.4.1 Atividades Biológicas da Hispidulina

KUPCHAN (1969) observou que a hispidulina extraída de *Eupatorium cuneifolium* apresenta uma IC<sub>50</sub> de 22 unidades em células cultivadas de carcinoma humano de nasofaringe, em ensaios feitos no Centro Nacional de Serviço de Quimioterapia do Câncer dos Estados Unidos (CCNSC). LIU *et al.* (1985) também verificaram a atividade antineoplásica deste flavonóide utilizando células S180 de ratos e em cultura de hepatócitos.

A helenalina é um composto extraído do gênero *Arnica* que possui a capacidade de se ligar a grupos tióis e inibir várias enzimas que possuem este grupamento, exercendo assim efeitos citotóxicos. WOERDENBAG *et al.* (1995) testaram a capacidade de diversas flavonas e flavonóis também extraídos do gênero *Arnica* em reduzir a citotoxicidade induzida por helenalina em células de carcinoma humano de pulmão. Os autores verificaram que entre os compostos testados, aqueles que possuíam grupamento metóxi na posição 6 foram os moduladores mais efetivos da atividade deste composto, sendo que a hispidulina exerceu tais efeitos numa ampla faixa de concentração (1, 5 e 10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ), sendo capaz de aumentar o IC<sub>50</sub> da helenalina em até cerca de 142%.

Demonstrou-se também sua capacidade antioxidante *in vivo* pela inibição da hepatotoxicidade causada por bromobenzeno, sendo capaz de neutralizar os efeitos da depleção de glutathiona, uma vez que a hispidulina (150 mg/Kg) apresentou atividade semelhante à da N-acetilcisteína (150 mg/Kg), composto referência como antídoto contra injúria hepática e lipoperoxidação (FERRÁNDIZ *et al.*, 1994; SANZ *et al.*, 1994). A hispidulina apresentou também efeitos inibitórios dose dependentes na peroxidação lipídica utilizando homogenato de fígado de rato apresentando IC<sub>50</sub> de 64  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , entretanto neste mesmo trabalho verificou-se que a hispidulina é um fraco sequestrador de ânion superóxido (YUTING *et al.*, 1990). Ainda como agente hepatoprotetor, SOICKE *et al.* (1987), demonstraram que entre todos os flavonóides presentes na planta medicinal carqueja (*Baccharis trimera*) a hispidulina (10 e 50

mg/Kg) foi a única molécula, que isoladamente, foi capaz de reverter os efeitos da intoxicação hepática causada por (3,4 mg/Kg), o que segundo os autores, indica que a hispidulina provavelmente seja a molécula responsável pelos efeitos benéficos observados quando da ingestão de um infuso desta planta, uma vez que apesar do possível efeito sinérgico entre todos os componentes, nem o extrato bruto nem uma fração concentrada com os demais flavonóides demonstraram efeitos tão potentes quanto a hispidulina isoladamente.

Por outro lado, SANZ *et al.*, (1994) verificaram a atividade pró-oxidante da hispidulina, pela capacidade de estimular a degradação de desoxirribose num sistema contendo  $\text{Fe}^{+3}$ -EDTA na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Além dos efeitos antioxidantes apontados, a hispidulina também vem sendo utilizada pela sua atividade broncodilatadora, sendo o infuso de *Millingtonia hortensis*, planta da qual a hispidulina pode ser extraída, usada na Tailândia pela medicina popular no tratamento de tuberculose, asma e sinusite (ANULAKANAPAKORN *et al.*, 1987). A fim de verificar se este costume popular têm algum fundamento científico, o efeito da hispidulina em musculatura lisa de traquéia foi estudado por alguns autores. ABDALLA *et al.* (1988) observaram que a hispidulina inibe de forma dose-dependente contrações musculares induzidas por agonistas na ausência de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular, havendo indícios de que tal inibição ocorre devido à sua ligação a proteínas que regulam o  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, como a calmodulina, impedindo que este íon se ligue a tais proteínas, o que resulta na inibição da força de contração. Os resultados obtidos por estes mesmos autores indicam que a hispidulina ( $I_{50} = 9 \mu\text{g/ml}$ ) se mostrou mais potente que a aminofilina ( $I_{50} = 26 \mu\text{g/ml}$ ), droga bastante utilizada no tratamento da asma. Em concordância com o trabalho anteriormente citado, HAZEKAMP *et al.* (2001), também sugerem que a hispidulina extraída de *Clerodendrum petasites* possa ser útil para tratar asma, pois o extrato desta planta, de forma dose-dependente, causou relaxamento do músculo da traquéia frente a contração estimulada por histamina A, especialmente a porção do extrato onde havia predomínio

de hispidulina, sugerindo ainda que estes efeitos ocorrem através de mecanismo de ação diferentes das drogas convencionalmente utilizadas para tratar esta doença.

Além de todos os efeitos biológicos já citados, a hispidulina possui ainda a) efeito antiateromatoso quando administrada oralmente a ratos (SYROV *et al.*; 1985); b) efeito inibidor da agregação plaquetária por aumentar os níveis de AMPc nas plaquetas (BOURDILLAT; 1988) e c) propriedades antifúngicas (TAN R. X. *et al.*; 1999).

Quanto aos efeitos sobre o metabolismo mitocondrial, COLEMAN *et al.*, (1984) sugeriram que a hispidulina promove o desacoplamento da fosforilação oxidativa, entretanto o autor analisou somente a velocidade respiratória do estado III e a relação ADP/O, com uma única dose do flavonóide ( $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ), onde observou-se um decréscimo na velocidade de consumo de oxigênio no estado III de 14% e 10% e redução e sobre a razão ADP:O de 4 e 6,25%, utilizando como substratos oxidáveis glutamato e succinato respectivamente, sem entretanto determinar os efeitos deste flavonóide sobre a atividade das enzimas da cadeia respiratória, sobre a membrana e demais parâmetros respiratórios relacionados ao metabolismo mitocondrial. Contudo, o autor sugere que o grupo hidroxila na posição 3 seria necessário para inibição do estado III.

Recentemente, ROCHA (2000)<sup>1</sup> verificou os efeitos da hispidulina nas doses de 0,05; 0,075; 0,1; 0,15 e 0,2  $\text{mmol.l}^{-1}$  através de análises polarográficas, utilizando mitocôndrias isoladas de fígado de rato. As tabelas 1 e 2 resumem os resultados dos efeitos da hispidulina sobre os seguintes parâmetros respiratórios: velocidade de consumo de oxigênio na presença de ADP (estado III) e após o consumo de ADP (estado IV); coeficiente de controle respiratório (CCR) e a razão ADP/O cujos resultados nortearam os experimentos que realizamos na sequência.

<sup>1</sup> Comunicação pessoal do autor (2000).

Observa-se um decréscimo estatisticamente significativo na velocidade respiratória do estado III, de aproximadamente 15 % e 25 % com as doses iniciais (0,05, 0,075 e 0,1 mmol.l<sup>-1</sup>) passando para 33% e 42% nas doses de 0,15 e 0,2 mmol.l<sup>-1</sup> respectivamente, quando glutamato foi utilizado como substrato oxidável. Entretanto, quando foi utilizado succinato como substrato oxidável observou-se inibição estatisticamente significativa de cerca de 1% % com as doses iniciais (0,05, 0,075 e 0,1 mmol.l<sup>-1</sup>), atingindo ao máximo aproximadamente 26% e 27% de inibição com as doses de 0,15 e 0,2 mmol.l<sup>-1</sup>.

Já em relação à velocidade respiratória no estado IV, observa-se um estímulo estatisticamente significativo de 30% e 65%, para as doses de 0,15 e 0,2 mmol.l<sup>-1</sup> respectivamente, com glutamato como substrato e quando utilizou-se succinato, obteve-se estímulo estatisticamente significativo da ordem de 50% com as doses de 0,075, 0,1, 0,15 e de cerca de 65% com a dose de 0,2 mmol.l<sup>-1</sup>.

Como consequência da inibição da velocidade respiratória no estado III e estímulo da velocidade respiratória no estado IV da respiração mitocondrial, verifica-se uma diminuição dose dependente estatisticamente significativa nos valores do coeficiente de controle respiratório (CCR), com todas as doses de hispidulina testadas, com ambos os substratos, atingindo até 60% de inibição com a dose máxima utilizada (0,2 mmol.l<sup>-1</sup>).

Em relação à razão ADP/O, pode-se verificar uma diminuição estatisticamente significativa de aproximadamente 15% e 30% pela hispidulina (0,15 e 0,20 mmol.l<sup>-1</sup>, respectivamente), quando utilizou-se o glutamato como substrato e com as doses de 0,1, 0,15 e 0,20 mmol.l<sup>-1</sup> a hispidulina reduziu cerca de 18%, 23% e 40% respectivamente, os valores desta razão quando foi utilizado o succinato como substrato oxidável.

TABELA 1- EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE OS PARÂMETROS RESPIRATÓRIOS UTILIZANDO GLUTAMATO DE SÓDIO COMO SUBSTRATO OXIDÁVEL.

HISPIDULINA (mmol.l <sup>-1</sup> )	Velocidade Respiratória no Estado III (%)	Velocidade Respiratória no Estado IV (%)	CCR	ADP:O
0,05	82,79 ± 9,66*	101,41 ± 11	84,26 ± 12,17*	120,46 ± 24,75
0,075	84,43 ± 5,75*	111,64 ± 10,51	77,98 ± 7,31*	102,51 ± 14,9
0,10	75,81 ± 7,96*	107,74 ± 9,78	69,76 ± 9,49*	101,36 ± 9,88
0,15	67,90 ± 8,42*	131,9 ± 9,4 *	52,53 ± 9,53*	85,94 ± 12,12*
0,20	58,12 ± 9,09*	165,15 ± 3,1 *	38,6 ± 7,42*	69,33 ± 16,12*

FONTE: ROCHA, 2000<sup>1</sup>

Sistema de Reação em volume final de 1,3 ml: D-manitol 125 mmol.l<sup>-1</sup>, KCl 65 mmol.l<sup>-1</sup>, tampão Hepes 10 mmol.l<sup>-1</sup>(pH 7,2), BSA 0,1g%, glutamato de sódio 5 mmol.l<sup>-1</sup>, Pi 1,6 mmol.l<sup>-1</sup>, ADP 0,16 mmol.l<sup>-1</sup> e 2 mg de proteína mitocondrial. Os resultados representam a média das triplicatas de 6 experimentos independentes realizados à temperatura de 28°C. Os resultados estão expressos em porcentagem relativas ao controle (100%) que equivale a 58,36 nanoátomos de oxigênio.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> proteína mitocondrial no estado 3; 12,4 nanoátomos de oxigênio.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> proteína mitocondrial no estado IV; 3,17 nanoátomos de oxigênio.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> proteína mitocondrial na razão ADP:O, e CCR de 4,9 em 1,3 ml de meio.

\* Valores estatisticamente significativos relativos ao controle (100%) – p ≤ 0,05.

TABELA 2- EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE OS PARÂMETROS RESPIRATÓRIOS UTILIZANDO SUCCINATO DE POTÁSSIO COMO SUBSTRATO OXIDÁVEL.

HISPIDULINA (mmol.l <sup>-1</sup> )	Velocidade Respiratória no Estado III (%)	Velocidade Respiratória no Estado IV (%)	CCR	ADP:O
0,05	85,5 ± 5,76*	125,74 ± 9,45	67,35 ± 10,86*	93,82 ± 4,82
0,075	86,95 ± 6,88*	147,42 ± 11,6*	60,15 ± 5,5*	93,43 ± 4,87
0,10	86,11 ± 5,64*	155,88 ± 22,6*	63,15 ± 1,82*	82,21 ± 10,05*
0,15	74,82 ± 7,08*	153,38 ± 1,92 *	54,5 ± 9,08*	77,72 ± 9,43*
0,20	73,53 ± 11,96*	165,5 ± 1,64 *	41,37 ± 4,6*	60,42 ± 6,44*

FONTE: ROCHA, 2000<sup>1</sup>

Sistema de Reação em volume final de 1,3 ml: D-manitol 125 mmol.l<sup>-1</sup>, KCl 65 mmol.l<sup>-1</sup>, tampão Hepes 10 mmol.l<sup>-1</sup>(pH 7,2), BSA 0,1g%, succinato de potássio 3 mmol.l<sup>-1</sup>, Pi 0,8 mmol.l<sup>-1</sup>, ADP 0,08 mmol.l<sup>-1</sup> rotenona 1μmol.l<sup>-1</sup> e 0,5 mg de proteína mitocondrial. Os resultados representam a média das triplicatas de 5 experimentos independentes realizados à temperatura de 28°C. Os resultados estão expressos em porcentagem relativas ao controle (100%) que equivale a 135,4 nanoátomos de oxigênio.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> proteína mitocondrial no estado 3; 31,84 nanoátomos de oxigênio.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> proteína mitocondrial no estado IV; 1,17 nanoátomos de oxigênio.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> proteína mitocondrial na razão ADP:O, e CCR de 4,3 em 1,3 ml de meio.

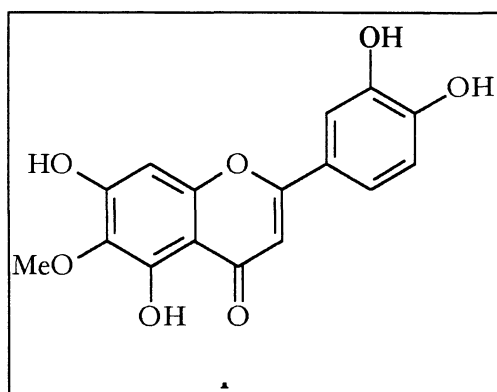
\* Valores estatisticamente significativos relativos ao controle (100%) – p ≤ 0,05.

<sup>1</sup> Comunicação pessoal do autor (2000).

### 1.5 EUPAFOLINA

A eupafolina (5, 7, 3',4' tetrahidroxi-6 metóxi flavona) (figura 4), também conhecida como nepetina, assim como a hispidulina, é pertencente à classe das flavonas (núcleo básico na figura 1A). Como pode ser observado, a eupafolina se distingue da hispidulina por possuir uma hidroxila a mais na posição 3' do anel B, em posição orto em relação à hidroxila em 4', formando um anel catecol.

FIGURA 4: ESTRUTURA QUÍMICA DA EUPAFOLINA



FONTE: FREHSE, 1999.

Para o presente estudo, a eupafolina também foi extraída da planta *Eupatorium littorale* (FREHSE, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2001). A eupafolina também pode ser encontrada em várias outras plantas, muitas das quais onde há também a ocorrência da hispidulina, podendo-se citar: *Salvia lavandulifolia* (CANIGUERARAL *et al.*, 1989), cujas folhas são usadas como condimento, além de usos na medicina popular como cicatrizante e hipoglicemiante; *Salvia officinalis* (MIURA *et al.*, 2002), *Artemisia vulgaris* (SANG *et al.*, 1999, 2000), cujas folhas são amplamente utilizadas na culinária asiática; *Centaurea chilensis* (NEGRETE *et al.*, 1988); *Centaurea phyllocephala* (TWAII *et al.*, 1983) usada na medicina popular como “agente antidiabético”, *Lippia citriodora* (Lemon verbena) (VALENTÃO *et al.*, 1999), cujas folhas são usadas industrialmente como aromatizante de bebidas ou na medicina popular como infusos para fins antiespasmódicos, antipiréticos e para distúrbios gástricos; *Salvia Artemisia giraldui* (TAN *et al.*, 1999); *Baccharis trimera less*

(SOICKE H. *et al.*, 1987), a carqueja; *Eupatorium cannabinum* L. (ELEMA *et al.*, 1989), entre outras.

### 1.5.1 Atividades Biológicas da Eupafolina

Podem ser considerados um tanto escassos os relatos dos efeitos biológicos da eupafolina na literatura, porém, a grande maioria dos estudos apontam resultados que indicam que esta é uma molécula extremamente reativa sob diferentes aspectos, fato que é esperado devido à configuração dos seus grupamentos hidroxila no anel B. Alguns destes efeitos serão descritos a seguir.

SANG *et al.* (1999, 2000) observaram que a eupafolina é capaz de inibir a monoaminoxidase (MAO) com  $I_{50}$  de  $25 \mu\text{mol.l}^{-1}$  e também demonstraram sua atividade antioxidante através da inibição da lipoperoxidação com valores de  $I_{50}$  de  $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . MIURA *et al.* (2002) relatam que a eupafolina possui atividade antioxidante comparável à do  $\alpha$ -tocoferol avaliada pelo método do índice de estabilidade do óleo e também através da sua reatividade com o radical livre estável DPPH através de método espectrofotométrico, ensaio que também foi realizado no presente estudo com esta flavona, com a finalidade de compará-los com os resultados obtidos com a hispidulina.

KUPCHAN (1969) verificou que a eupafolina extraída de *Eupatorium cuneifolium* apresenta  $IC_{50}$  de 18 unidades em células cultivadas de carcinoma humano de nasofaringe, em ensaios feitos pelo Centro Nacional de Serviço de Quimioterapia do Câncer dos Estados Unidos (CCNSC).

SANZ *et al.*, (1994) verificaram que entre uma série de flavonóides testados, a eupafolina foi o composto mais potente contra lipoperoxidação enzimática e não enzimática num sistema contendo  $\text{Fe}^{+2}$  – ascorbato, com  $I_{50}$  de aproximadamente  $8 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Neste mesmo estudo, assim como anteriormente relatado para a hispidulina,

demonstrou-se também sua capacidade antioxidante *in vivo* pela inibição da hepatotoxicidade causada por bromobenzeno, sendo capaz de neutralizar os efeitos da depleção de glutathione, uma vez que a eupafolina apresentou atividade semelhante à da N-acetilcisteína, composto referência como antídoto contra injúria hepática e lipoperoxidação, observou-se também sua capacidade de inibir a xantina oxidase com  $I_{50}$  de aproximadamente  $12,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ , sendo que este último efeito não é exercido pela hispidulina, conforme indicam os resultados do autor (SANZ *et al.*; 1994).

Em relação aos efeitos sobre o metabolismo mitocondrial, COLEMAN *et al.*, (1984) relataram que a eupafolina promove desacoplamento da fosforilação oxidativa, porém, assim como para a hispidulina, foram verificados somente a velocidade respiratória do estado III e a relação ADP/O utilizando como substratos glutamato e succinato, com apenas uma dose do flavonóide ( $40 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ), onde observou-se um decréscimo na velocidade de consumo de oxigênio no estado III de 45% e 14% e redução de 33% e 13,3% sobre a razão ADP:O, sem determinar os efeitos deste flavonóide sobre a atividade das enzimas da cadeia respiratória, sobre membranas e demais parâmetros respiratórios relacionados ao metabolismo mitocondrial.

Ainda sobre os parâmetros mitocondriais, HODNICK *et al.* (1986, 1987), verificaram efeitos de vários flavonóides sobre as atividades enzimáticas da NADH-oxidase e succinato oxidase, entre eles encontra-se a luteolina como um dos compostos mais potentes, apresentando valores de  $I_{50}$  para atividade de ambas as enzimas na faixa de nanomolar. A luteolina também é uma flavona, e apresenta o mesmo padrão de hidroxilação da eupafolina nos anéis A e C, diferindo desta apenas pelo grupo metóxi em C-6 do anel B, sendo esta última característica estrutural menos importante sobre a atividade do composto. Como os efeitos da luteolina foram atribuídos à presença do grupo catecol no anel B e duplas ligações entre C-2 e C-3, também presentes na eupafolina, poderia ser sugerida a possibilidade desta molécula ter efeito similar.



## 1.6 EFEITOS DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO E DA MISTURA HISPIDULINA:EUPAFOLINA (1:1) DE *Eupatorium litoralle* Cabrera SOBRE SNC E MUSCULATURA ESQUELÉTICA E LISA NÃO VASCULAR

Recentemente HANSAUL *et al.* (2002) verificaram os efeitos do extrato bruto metanólico da *Eupatorium litoralle* cabrera e/ou da mistura hispidulina:eupafolina (1:1) sobre a musculatura esquelética (utilizando músculo sartório intacto de rã), sistema nervoso central e musculatura lisa não vascular (utilizando diafragma isolado de camundongos Swiss e preparações isoladas de jejuno, íleo e útero de ratas). Os autores sugerem que sobre a musculatura esquelética o extrato bruto (1 mg/ml) pode agir sobre receptores DHRP ou em canais de liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático. Com os flavonóides hispidulina:eupafolina (1:1) sugere-se que haja inicialmente uma despolarização da membrana (fase fásica) por ação sobre a placa motora, seguida de indução da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (fase tônica). No músculo diafragma verificou-se um aumento na amplitude e força de contração.

Sobre o SNC o extrato bruto teria provocado um efeito depressor em camundongos tratados via oral com 1 mg/Kg sem alterações significativas da resposta sobre a coordenação e força muscular avaliada pelos demais testes realizados.

Quanto aos efeitos sobre musculatura lisa não vascular os autores verificaram que o extrato bruto possui efeito colinolítico, não envolvendo o bloqueio de canais de cálcio tipo L. As doses utilizadas do extrato bruto metanólico foram de 6, 12, 25 e 50 µg/ml. Os flavonóides (1:1) também apresentaram atividade colinolítica competitiva na concentração de 2,5 µg/ml e atividade antagonista não competitiva irreversível nas concentrações de 0,5, 1,0, e 2,5 µg/ml. Os autores sugeriram o envolvimento de mobilização de cálcio ou de sensibilização de cálcio na dependência da ativação da proteína G.

## 1.7 LIBERAÇÃO DE FERRO DE FERRITINA E PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO INDUZIDA POR XENOBIÓTICOS

Existem evidências de que o ferro pode estar envolvido na citotoxicidade de muitos compostos que sofrem ciclo redox, incluindo-se na formação de radicais  $\text{OH}^\bullet$ . Uma das formas de gerar-se o radical  $\text{OH}^\bullet$  é através da decomposição da  $\text{H}_2\text{O}_2$  dependente de  $\text{Fe}^{+2}$ , chamada reação de Fenton ( $\text{Fe}^{+2} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{+3} + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$ ), um processo importante *in vivo*, uma vez que o radical hidroxila é uma espécie extremamente reativa podendo causar inúmeros tipos de injúrias celulares (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990).

Embora o ferro e outros metais de transição potencializem os efeitos deletérios de várias moléculas, nos organismos vivos normalmente não há ferro na forma livre disponível para reações geradoras de radicais livres, estando quelados com ácidos orgânicos como o citrato ou nucleotídeos de adenina, ou então ligados em proteínas com várias funções, entre elas armazenadora de ferro como a ferritina, ou proteínas de transporte deste metal, como a transferrina (HALLIWELL, 1987; PUPPO, 1992).

A ferritina é a principal proteína envolvida no armazenamento do ferro em mamíferos, mas também encontrada em outros organismos vivos, como bactérias e plantas (HARRISON *et al.*, 1991; HARRISON & AROSIO, 1996). Cada molécula consiste da apoproteína externa, composta por 24 subunidades, e de um núcleo mineral central de hidróxido férrico associado a fosfato, que quando completamente ocupado pode acomodar até 4500 átomos de ferro (WATT *et al.*; 1985). Neste sentido, a ferritina exerce efeito protetor sobre os organismos vivos dos efeitos deletérios do ferro enquanto o mantém armazenado no seu núcleo mineral, evitando que este metal possa participar de reações geradoras de radicais livres. Entretanto, quando necessário, este ferro pode ser facilmente mobilizado. Quando esta mobilização ocorre de forma inadequada, como por exemplo por ação de um xenobiótico com capacidade redutora, a ferritina será uma possível fonte de ferro, disponibilizando o metal livre para gerar espécies reativas de oxigênio através de reações de Fenton, passando a ter uma ação

pró-oxidante, e não protetora, podendo provocar danos celulares e até carcinogênese, o que torna importante o estudo da liberação de ferro da ferritina.

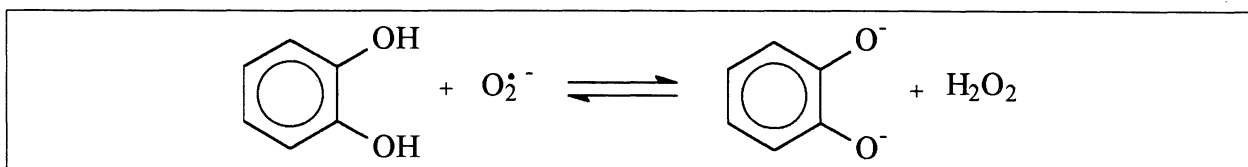
Existem relatos na literatura sobre vários xenobióticos,  $O_2^{\bullet-}$  e algumas semiquinonas serem capazes de liberar ferro da ferritina por mecanismo redutor (FUNK *et al.*, 1985; MONTEIRO *et al.*, 1989). Entre as moléculas capazes de liberar ferro da ferritina encontramos algumas que possuem na sua estrutura o anel catecol, como a 6-hidroxidopamina. Esta molécula sofre oxidação rapidamente na presença de metais de transição, podendo gerar semiquinonas e quinonas, juntamente com  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  e OH (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990). Semiquinonas sob condições fisiológicas não parecem reagir com  $H_2O_2$  para dar  $OH^{\bullet}$ . Contudo, muitas delas podem reduzir íons metálicos de transição e promover a geração de  $OH^{\bullet}$  (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990). Entre os flavonóides estudados neste trabalho encontramos a eupafolina que possui na sua estrutura o anel catecol, podendo desta forma possivelmente estar envolvida em reações semelhantes às observadas com a 6 hidroxidopamina, o que verificaremos neste trabalho.

Existem mecanismos distintos que podem ser responsáveis pela indução da mobilização de ferro da ferritina, entre eles: a) através da redução do ferro do núcleo mineral (CRICHTON *et al.*, 1975; FUNK *et al.*, 1985; MONTEIRO *et al.*, 1989); b) através de alterações na estrutura da apoferritina c) por capacidade de quelar o ferro (JONES *et al.*; 1978).

Sabe-se também que sob condições aeróbias a redução de quinonas é geralmente associada com a produção de  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$  (VASANTHA *et al.*, 1992), gerando-se semiquinonas, a partir da oxidação de difenóis pelo radical  $O_2^{\bullet-}$ , em uma reação reversível (figura 5). Sendo assim, cabe ainda salientar a importância do estudo dos efeitos de compostos fenólicos, entre eles alguns flavonóides, utilizando mitocôndrias isoladas como modelo experimental pois, em níveis fisiológicos de oxigênio, tem-se sugerido que de 1 a 3% do  $O_2$  é reduzido para  $O_2^{\bullet-}$  na mitocôndria em condições normais, sendo que a mais importante fonte de  $O_2^{\bullet-}$  *in vivo* em células aeróbias é a

cadeia de transporte de elétrons (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990). Considerando a semelhança estrutural entre flavonóides que possuem anel catecol e aqueles possuindo grupos difenóis, pode-se sugerir reação semelhante para pelo menos um dos compostos em estudo, a eupafolina.

FIGURA 5 – FORMAÇÃO DE SEMIQUINONAS A PARTIR DA OXIDAÇÃO DE DIFENÓIS.



FONTE: HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990

Embora anteriormente tenha sido apontada a possibilidade de moléculas como os flavonóides poderem liberar o ferro da ferritina devido à sua semelhança estrutural com as quinonas e difenóis, segundo HALLIWELL & GUTTERIDGE (1999), os fenóis com dois grupos OH adjacentes, ou estrutura quelante, bem como os flavonóides, podem complexar-se a metais de transição (especialmente ferro e cobre) diminuindo a atividade destes na geração de radicais livres, o que somado à capacidade seqüestradora destes radicais, explica os efeitos antioxidantes de alguns flavonóides. Contudo, quando complexado com o metal, os flavonóides tornam-se incapazes de reagir com qualquer outra espécie radical, compensando seu efeito protetor em relação ao ferro (ARORA *et al.*; 1998).

PUPPO (1992) demonstrou que os flavonóides possuem tanto a capacidade de aumentar quanto de reduzir a formação de radicais hidroxila gerados por ferro quelado através de reações de Fenton. Neste estudo, os radicais hidroxila gerados foram monitorados de duas maneiras: a) medida colorimétrica da extensão da degradação da deoxirribose ou b) através da hidroxilação aromática da fenilalanina, sendo os três isômeros de tirosina avaliados por HPLC, e observou-se diferenças nos efeitos das moléculas em virtude dos agentes quelantes de ferro utilizados nos sistemas de reação. Quando utilizou-se ATP e citrato não se observou aumento na produção de  $\text{OH}^\bullet$  pelos

flavonóides quercetina e mirecitina, entretanto, quando no sistema de reação o ferro estava quelado com EDTA, os mesmos flavonóides que no sistema anterior haviam demonstrado efeito protetor passaram a estimular a produção dos radicais  $\text{OH}^\bullet$ . O autor sugere que tais diferenças ocorram devido ao grau de facilidade com que estes flavonóides podem se oxidar, e, assim, atuar no ciclo redox do ferro, o EDTA altera o potencial redox e a solubilidade do ferro, já com quelantes mais fisiológicos como o citrato e ATP o autor encontrou indícios de que este ciclo redox não ocorra, o que explica a ausência de estímulo na produção de radicais hidroxila. Assim, pode-se esperar que *in vivo*, os efeitos dos flavonóides sejam benéficos, atuando principalmente como seqüestradores de radicais livres e não como pró-oxidantes.

Sabe-se que a capacidade de um composto quelar ferro está intimamente relacionada ao seu caráter de hidrofobicidade. AFANAS'EV *et al.*; (1989) demonstraram que entre as substâncias capazes de penetrar em células humanas e quelar ferro, encontram-se os flavonóides rutina e quercetina. Entretanto a rutina, por ser mais hidrosolúvel, mostra-se menos capaz de atingir o interior celular. Já a quercetina, pela sua hidrofobicidade, penetra mais facilmente nos eritrócitos, sendo capaz de quelar ferro que foi liberado por desferrioxamina, protegendo-os assim dos efeitos deletérios provocados por este metal livre, como a lipoperoxidação e conseqüente hemólise (FERRALI *et al.*, 1997).

Pode-se ressaltar ainda que os relatos da literatura mostram que alguns flavonóides em presença de metais de transição, formam complexos com ferro e cobre, o que aumentaria suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (AFANAS'EV *et al.*, 2001; KOSTIUK *et al.*, 2001).

Portanto, pode-se verificar que dependendo da estrutura química do flavonóide ele pode atuar tanto como antioxidante quanto como pró-oxidante na presença de íons de metais de transição, colaborando para suas atividades biológicas por diferentes mecanismos. Considerando que ainda não são conhecidos detalhes sobre os efeitos do

envolvimento da hispidulina e da eupafolina com metais de transição nas suas propriedades, este foi um dos aspectos abordado neste estudo.

## 2. OBJETIVOS

O aumentado número de patologias correlacionadas com a produção de radicais livres colocam os flavonóides como substâncias de grande interesse de estudo (FRAGA *et al.*, 1987), devido às suas propriedades antioxidantes. Considerando a existência de vários trabalhos onde se relacionam a estrutura com atividade biológica de inúmeros flavonóides, incluindo a hispidulina e a eupafolina, com destaque especial para suas já demonstradas propriedades antioxidantes e antineoplásicas, têm-se neste trabalho o interesse de complementar os estudos quanto ao seu mecanismo de ação, visto que até o momento não foram descritos na literatura maiores detalhes a este respeito. Estes estudos tornam-se importantes especialmente porque segundo HODNICK *et al.* (1987), alguns dos efeitos dos flavonóides, como a atividade citotóxica, podem ser resultado de alterações na bioenergética celular e inibição da respiração mitocondrial, como observados por COLEMAN (1984) e ROCHA (2000)<sup>1</sup>.

Portanto, no desenvolvimento deste trabalho o objetivo central foi elucidar o mecanismo de ação do flavonóide hispidulina (5,7,4'-trihidroxí-6'-metoxi flavona) sobre o metabolismo energético mitocondrial, e analisar algumas de suas propriedades químicas que possam colaborar para o melhor entendimento de seus efeitos, utilizando a eupafolina para estudos comparativos de suas propriedades antioxidantes.

Sendo assim, tivemos os seguintes objetivos específicos:

- ☞ Avaliar os efeitos da hispidulina sobre os seguintes parâmetros mitocondriais:
  - a) transporte de elétrons e fosforilação oxidativa
  - b) atividades das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial, e
  - c) inchamento de mitocôndrias energizadas e não energizadas com glutamato de sódio;

<sup>1</sup> Comunicação pessoal do autor (2000).

- ↪ Verificar se a hispidulina se comporta como um agente inibidor do transporte de elétrons;
- ↪ Determinar se a hispidulina e eupafolina promovem liberação de ferro da ferritina e se são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio;
- ↪ Avaliar a capacidade antioxidante da hispidulina e eupafolina através de sua reatividade com o radical livre estável DPPH;
- ↪ Comparar os efeitos obtidos com a hispidulina e eupafolina no que diz respeito aos efeitos antioxidantes, correlacionando-os às diferenças estruturais entre as duas moléculas.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. REAGENTES

Glutamato de sódio, succinato de sódio, NADH, ATP, ADP, EGTA, EDTA, FCCP, DPPH, BHT, rotenona, D-manitol, sacarose, HEPES, BSA, fosfoenolpiruvato, valinomicina, oligomicina, citocromo *c*, ferrocitocromo *c*, sulfonato de batofenantrolina, ferritina de baço de cavalo, e Tris foram adquiridos da Sigma Chemical Co<sup>®</sup>. (EUA). Hidróxido de potássio, cloreto de potássio, clorofórmio, fosfato monobásico de potássio, fosfato dibásico de potássio, ácido clorídrico, ácido sulfúrico, heptamolibdato de amônio, sulfato ferroso foram adquiridos da Merck<sup>®</sup> do Brasil.

Os demais reagentes utilizados foram do melhor grau analítico comercialmente disponível. As soluções dos reagentes foram preparadas com água deionizada através de sistema purificador Millipore Milli Q<sup>®</sup>.

#### 3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE HISPIDULINA E EUPAFOLINA

A hispidulina e a eupafolina foram extraídas da planta *Eupatorium littorale* e cedidas gentilmente pelo Dr. Brás Heleno de Oliveira, do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná. As drogas que se apresentam na forma de cristais amarelos foram solubilizadas em DMSO numa concentração estoque de 10 mmol . l<sup>-1</sup> e diluídas posteriormente durante os ensaios para que se atingissem as concentrações finais desejadas em cada experimento.

### 3.3. ANÁLISES DOS EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE O METABOLISMO MITOCONDRIAL

#### 3.3.1 Animais

Para o isolamento de mitocôndrias, foram utilizados ratos albinos, da linhagem Wistar, machos, pesando de 200-300 g, mantidos pelo biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram alimentados com ração Purina® e antes dos experimentos foram colocados em jejum por 12 horas com água *ad libidum*. Os animais foram sacrificados por decapitação, sem anestesia, e o fígado foi rapidamente retirado e colocado no meio de isolamento, sendo mantido em banho de gelo durante todo o processamento.

#### 3.3.2 Isolamento de Mitocôndrias de Fígado de Rato para Determinação do Consumo de Oxigênio, Atividades Enzimáticas e Inchamento Mitocondrial

Mitocôndrias de fígado de rato foram isoladas como descrito por VOSS *et al.* (1961), utilizando como meio de isolamento: D-manitol 250 mmol.l<sup>-1</sup>, Hepes-KOH 10 mmol.l<sup>-1</sup> (pH 7,2) e soroalbumina bovina (BSA) 0,1 g%. Os animais foram sacrificados como já descrito, o fígado foi removido e lavado com o meio de isolamento e conservado em banho de gelo. O material foi picado com tesoura em pequenos pedaços, lavado pelo menos três vezes com o mesmo meio e homogeneizado utilizando-se o homogeneizador van Potter-Elvehjem por três vezes com o pistilo frouxo e duas vezes com o pistilo normal, sucessivamente. O homogeneizado obtido foi então centrifugado em centrífuga Beckman J-21B refrigerada entre 2°C – 4°C a 320.g por 5 minutos. Nesta primeira etapa de centrifugação, desprezou-se o sedimento, que continha restos de células intactas, membranas e núcleos, e o sobrenadante que contém as mitocôndrias, foi centrifugado novamente a 12600.g por 10 minutos. O sedimento obtido foi ressuspenso com meio de isolamento e centrifugado a 8100 . g

por 10 minutos. Este procedimento foi repetido por duas vezes. Por fim, foi obtida a suspensão mitocondrial, com concentração protéica final variando de 20 a 100 mg/ml.

Para os experimentos de *swelling* mitocondrial o procedimento, bem como o meio de extração utilizado foram idênticos, omitindo-se apenas da última lavagem o EGTA. A suspensão mitocondrial obtida foi conservada em banho de gelo e utilizada imediatamente, ou então congelada em N<sub>2</sub> líquido, quando destinada à determinação das atividades enzimáticas da cadeia respiratória mitocondrial.

### 3.3.3 Análises Polarográficas para Caracterização da Hispidulina como Agente Inibidor do Transporte de Elétrons

Para caracterização da hispidulina como um agente inibidor do transporte de elétrons foram utilizadas mitocôndrias de fígado de rato (2 mg) isoladas segundo método de VOSS *et al.* (1961) (descrito no item 3.3.2) e meio de incubação contendo: tampão Hepes 10 mmol.l<sup>-1</sup> (pH 7,2), EGTA 0,1 mmol.l<sup>-1</sup>, manitol 125 mmol.l<sup>-1</sup>, KCl 65 mmol.l<sup>-1</sup> e suplementadas com glutamato de sódio 5 mmol.l<sup>-1</sup>, Pi 1,6 mmol.l<sup>-1</sup> e ADP 0,32 mmol.l<sup>-1</sup>, e nas análises complementares ainda foi adicionado o FCCP 1 μmol.l<sup>-1</sup>. A hispidulina foi adicionada em diferentes concentrações (0,05 a 1,0 mmol.l<sup>-1</sup>) e os traçados comparados aos dos experimentos controle.

Os experimentos foram realizados em volume final de 1,3 ml, sob agitação constante em câmara termostatzada a 28°C (VOSS *et al.*, 1961). O consumo de O<sub>2</sub> por mitocôndrias intactas nas diferentes situações foi determinado polarograficamente em oxígrafo Gilson, utilizando um eletrodo de oxigênio tipo Clark (Yellow Springs Instruments Co.), acoplado a um registrador. Os resultados foram expressos em nanomoles de O<sub>2</sub> consumidos<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>.mg de proteína<sup>-1</sup> considerando-se a solubilidade do O<sub>2</sub> na água, à temperatura utilizada, a 1 atm (ESTABROOK, 1967) e em percentagens de velocidade de consumo de oxigênio relativas aos controles. O coeficiente de controle respiratório (CCR), foi obtido da relação entre a velocidade respiratória na presença de ADP (estado III) e a velocidade após o consumo de ADP (estado IV).

### 3.3.4 Preparo da Suspensão de Mitocôndrias Rompidas para Determinação de Atividades Enzimáticas Mitocondriais

Mitocôndrias isoladas de fígado de rato, conforme descrito anteriormente (item 3.3.2) utilizando-se o método de VOSS *et al.* (1961), foram congeladas em nitrogênio líquido até o momento do seu uso, quando então foram rompidas por choque térmico (congelamento e descongelamento por 3 vezes) e mantidas em banho de gelo durante o tempo dos ensaios. Foram obtidos fragmentos de membrana, nos quais todos os componentes da cadeia respiratória apresentaram atividade satisfatória.

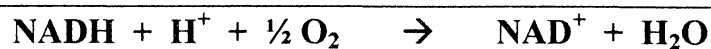
### 3.3.5 Determinação da Atividade das Enzimas Relacionadas com a Cadeia Respiratória Mitocondrial

A atividade das enzimas ligadas à cadeia respiratória foram determinadas espectrofotometricamente em espectrofotômetro Hitashi, modelo U-2001 UV/VIS equipado com impressora Epson LX 300 ou polarograficamente em oxígrafo Gilson, utilizando um eletrodo de oxigênio tipo Clark (Yellow Springs Instruments Co.), acoplado a um registrador.

#### 3.3.5.1 NADH Oxidase (NADH: Oxigênio Óxido-Redutase)

A atividade da NADH oxidase foi determinada pelo método polarográfico de SINGER (1974). O sistema de reação era composto por tampão fosfato 80 mmol.l<sup>-1</sup> (pH 7.4), EDTA 50mmol.l<sup>-1</sup>, NADH 0,17 mmol.l<sup>-1</sup> e 1 mg de proteína mitocondrial. As mitocôndrias foram incubadas por 2 minutos com cada concentração da droga, a reação ocorreu em temperatura controlada de 28°C, em volume final de 1,3 ml, sendo iniciada pela adição da proteína mitocondrial (T<sub>0</sub>). A velocidade de oxidação do NADH, que se traduziu na velocidade de consumo de oxigênio, foi acompanhada polarograficamente. Os resultados foram expressos em micromoles de oxigênio

consumido. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  de proteína, considerando a solubilidade do  $\text{O}_2$  em água, a 1 atm e a  $28^\circ\text{C}$  de  $235\mu\text{mol}.\text{l}^{-1}$  (ESTABROOK, 1967).



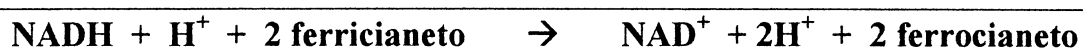
### 3.3.5.2 NADH Citocromo *c* Redutase (NADH Citocromo *c* Óxido-Redutase)

A atividade da NADH citocromo *c* redutase foi determinada espectrofotometricamente pelo método descrito por SOMLO (1965) em sistema de reação constituído de: tampão fosfato  $50 \text{ mmol}.\text{l}^{-1}$  (pH 7,4), EDTA  $2 \text{ mmol}.\text{l}^{-1}$ , NADH  $50 \mu\text{mol}.\text{l}^{-1}$ , citocromo *c* (oxidado)  $40 \mu\text{mol}.\text{l}^{-1}$ , NaCN  $1 \text{ mmol}.\text{l}^{-1}$  e 1,9 mg de proteína mitocondrial. Os reagentes presentes no sistema, exceto a enzima, foram incubados por 10 min a  $28^\circ\text{C}$ . A reação ocorreu a  $28^\circ\text{C}$ , em volume final de 1 ml, e foi iniciada pela adição da proteína mitocondrial ( $T_0$ ), sendo acompanhada pelo tempo de 2 minutos na presença das diferentes concentrações de hispidulina. A velocidade de redução do citocromo *c* foi acompanhada a 550nm. Para calcular a velocidade da reação utilizou-se o coeficiente de extinção molar  $\epsilon_{550 \text{ nm}}(\text{cit } c \text{ red-ox}) = 19.000 \text{ cm}^{-1}.\text{M}^{-1}$ . O resultado foi expresso em micromoles de citocromo *c* reduzido. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial.

### 3.3.5.3 NADH-Desidrogenase (NADH: Ferricianeto Óxido-redutase)

A atividade da NADH-desidrogenase foi determinada pelo método espectrofotométrico de SINGER (1974), usando o ferricianeto como acceptor artificial de elétrons na presença da rotenona, para bloquear a atividade da NADH-oxidase. O sistema de reação foi constituído de: tampão fosfato  $50 \text{ mmol}.\text{l}^{-1}$  (pH 7,4), EDTA  $2,0 \text{ mmol}.\text{l}^{-1}$ , NADH  $0,15 \text{ mmol}.\text{l}^{-1}$ , ferricianeto  $600 \mu\text{mol}.\text{l}^{-1}$ , rotenona  $1 \mu\text{mol}.\text{l}^{-1}$ , NaCN  $1 \text{ mmol}.\text{l}^{-1}$  e aproximadamente  $40\mu\text{g}$  de proteína mitocondrial. A reação ocorreu a

28°C, em volume final de 1 ml, e foi iniciada pela adição da proteína mitocondrial ( $T_0$ ), sendo acompanhada pelo tempo de 2 minutos na presença das diferentes concentrações de hispidulina. A reação foi monitorada a 420 nm e para calcular a velocidade da reação utilizou-se o coeficiente de extinção molar  $\epsilon_{420\text{nm}} = 1040 \text{ cm}^1 \cdot \text{M}^{-1}$ . Os resultados foram expressos em nanomoles de ferricianeto reduzido  $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial (CREUTZ & SUTIN, 1973).



#### 3.3.5.4 Succinato Oxidase (Succinato: Oxigênio Óxido-Redutase)

A atividade enzimática da succinato oxidase foi determinada polarograficamente pelo método de SINGER (1974). O sistema de reação em volume final de 1,3 ml foi constituído de: tampão fosfato  $80 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  (pH 7,4), EDTA  $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , rotenona  $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , succinato de sódio  $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  e 1 mg de proteína mitocondrial. As mitocôndrias foram incubadas por 2 minutos com cada concentração da droga, a reação ocorreu em temperatura controlada de 28°C, em volume final de 1,3 ml, sendo iniciada pela adição da proteína mitocondrial ( $T_0$ ). As mitocôndrias foram incubadas com cada concentração da droga por 2 minutos. A reação foi iniciada pela adição de succinato de sódio  $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  e ocorreu em temperatura controlada de 28°C. Os resultados foram expressos em nanomoles de oxigênio consumidos  $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial considerando a solubilidade do  $\text{O}_2$  em água, a 1 atm e a 28°C de  $235 \text{ } \mu\text{mols} \cdot \text{l}^{-1}$  (ESTABROOK, 1967).

### 3.3.5.5. Succinato Citocromo *c* Redutase (Succinato: Ferrocitocromo *c* Óxido-Redutase)

A atividade desta enzima foi determinada pelo método de SOMLO *et al.* (1965), medindo-se a redução do citocromo *c*, após o bloqueio da cadeia respiratória com NaCN 1 mmol.l<sup>-1</sup> e rotenona 1 μmol.l<sup>-1</sup>. O sistema de reação foi constituído de: tampão fosfato 50 mmol.l<sup>-1</sup> (pH 7,4), EDTA 2 mmol.l<sup>-1</sup>, NaCN 1 mmol.l<sup>-1</sup>, succinato de sódio 5 mmol.l<sup>-1</sup>, rotenona 1 μmol.l<sup>-1</sup> e 92 μg de proteína mitocondrial. Os reagentes presentes no sistema, exceto a enzima, foram incubados por 10 min a 28°C. A reação ocorreu a 28°C, em volume final de 1 ml, e foi iniciada pela adição da proteína mitocondrial (T<sub>0</sub>), sendo acompanhada pelo tempo de 2 minutos na presença das diferentes concentrações de hispidulina. e posteriormente por 2 minutos com cada concentração da droga, a reação ocorreu a 28°C, em volume final de 1 ml. A reação foi iniciada pela adição de 40 μmol.l<sup>-1</sup> do citocromo *c* (T<sub>0</sub>). A velocidade de redução do citocromo *c* foi acompanhada a 550 nm, e para calcular a velocidade da reação utilizou-se o coeficiente de extinção molar  $\epsilon_{550\text{nm}} = 19.000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ . A atividade enzimática resultante foi expressa em micromoles de citocromo *c* reduzido. min<sup>-1</sup>. mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial.

### 3.3.5.6. Succinato Desidrogenase (Succinato: Fenazina Metasulfato Óxido-Redutase)

A atividade da succinato desidrogenase foi determinada pelo método de SINGER (1974), utilizando-se DCPIP e PMS como aceitadores artificiais de elétrons. O sistema de reação em volume final de 1 ml foi constituído de: tampão fosfato de sódio 50 mmol.l<sup>-1</sup> (pH 7.4), succinato de sódio 20 mmol.l<sup>-1</sup>, EDTA 2 mmol.l<sup>-1</sup>, PMS 1 mmol.l<sup>-1</sup> e 15 μg de proteína mitocondrial. A reação ocorreu a 28°C, em volume final de 1 ml, e foi iniciada pela adição da pela adição de DCPIP 60 μmol.l<sup>-1</sup> (T<sub>0</sub>), sendo acompanhada pelo tempo de 2 minutos na presença das diferentes concentrações de hispidulina. A velocidade de redução do DCPIP foi monitorada em 600 nm e os

resultados expressos em micromoles de PMS reduzido. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial, utilizando-se o coeficiente de extinção molar  $\epsilon_{550\text{nm}} = 19.000 \text{ cm}^{-1}.\text{M}^{-1}$  para o DCPIP reduzido (SINGER, 1974).

### 3.3.5.7. Citocromo *c* Oxidase (Ferrocitocromo *c*: Oxigênio Óxido-Redutase)

A atividade da citocromo *c* oxidase foi determinada segundo método espectrofotométrico de MASON *et al.* (1973). O sistema de reação foi constituído de tampão fosfato 50  $\text{mmol.l}^{-1}$  (pH 7,4), EDTA 2  $\text{mmol.l}^{-1}$ , ferrocitocromo *c* reduzido 30  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  e 25 $\mu\text{g}$  de proteína mitocondrial. A reação ocorreu a 28°C, em volume final de 1 ml, e foi iniciada pela adição da proteína mitocondrial ( $T_0$ ), sendo acompanhada pelo tempo de 2 minutos na presença das diferentes concentrações de hispidulina. A velocidade de oxidação do citocromo *c* foi acompanhada a 550 nm, e para calcular a velocidade da reação foi utilizado o coeficiente de extinção molar  $\epsilon_{550\text{nm}} = 19.000 \text{ cm}^{-1}.\text{M}^{-1}$ . O resultado foi expresso em micromoles citocromo *c* oxidado. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial.

#### 3.3.5.7.1. Obtenção do Ferrocitocromo *c*

Citocromo *c* oxidado foi reduzido usando ditionito de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) como agente redutor. O ferrocitocromo *c* foi separado do excesso de ditionito por cromatografia em coluna de Sephadex G-25<sup>®</sup> médio (YONETANI & RAY, 1965). A concentração do citocromo *c* reduzido foi determinada espectrofotometricamente, utilizando-se o coeficiente de extinção molar  $\epsilon_{550\text{nm}} = 27.700 \text{ cm}^{-1} . \text{mol}^{-1}$  para a hemoproteína reduzida (MARGOLIASH, 1954). O ferrocitocromo *c* preparado por este método contém menos de 5% da proteína oxidada.



### 3.3.6 Determinação da Atividade ATPásica em Mitocôndrias Intactas na Presença e Ausência do Desacoplador FCCP

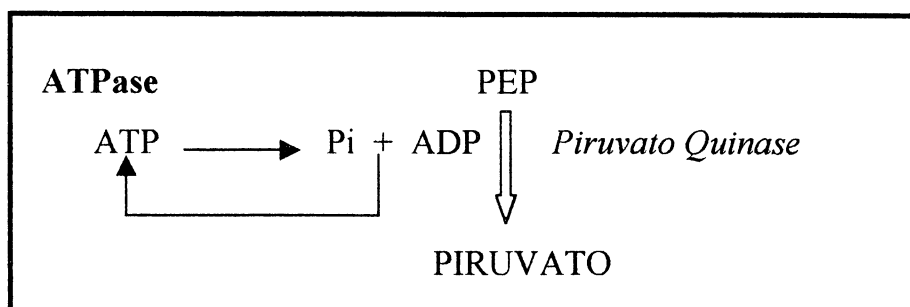
A atividade da  $F_1F_0$  ATPase (ATP fosfohidrolase) em mitocôndrias intactas na presença e ausência de FCCP foi determinada dosando-se o fosfato inorgânico ( $P_i$ ) decorrente da hidrólise de ATP, segundo o método descrito por PULMANN *et al.* (1960). O ensaio foi realizado a 37°C, em sistema de reação constituído por: sacarose 50 mmol.l<sup>-1</sup>, tampão Tris-HCl 12 mmol.l<sup>-1</sup> (pH 7.4), KCl 50 mmol.l<sup>-1</sup> e proteína mitocondrial na quantidade de 2 mg, nos experimentos na presença de FCCP, este foi adicionado na concentração de 1 µmol.l<sup>-1</sup>. O volume final da reação foi de 1 ml e a temperatura mantida em 28°C. A reação foi iniciada pela adição de ATP 3 mmol.l<sup>-1</sup> ( $T_0$ ) e mantida sob constante agitação, sendo interrompida após 10 minutos pela adição de TCA a 10%. O material foi centrifugado a 10000 x g por 1 minuto, sendo então o fosfato inorgânico do sobrenadante dosado pelo método de SUMNER (1944). A atividade da ATPase foi expressa em micromoles de  $P_i$  liberado.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> proteína.

### 3.3.7 Determinação da Atividade ATPásica em Mitocôndrias Rompidas

A atividade da  $F_1F_0$  ATPase (ATP fosfohidrolase) em mitocôndrias rompidas por ciclos congelamento/descongelamento foi determinada dosando-se o fosfato inorgânico decorrente da hidrólise de ATP, segundo o método descrito por PULMANN *et al.* (1960). Neste método, usa-se um sistema regenerador de ATP (figura 6). O sistema de reação em volume final de 1 ml foi constituído de tampão Tris-HCl 50 mmol.l<sup>-1</sup> (pH 7,4), MgSO<sub>4</sub> 3 mmol.l<sup>-1</sup>, fosfoenolpiruvato (PEP) 2,5 µmol.l<sup>-1</sup>, 10 unidades de piruvato quinase (1 unidade de piruvato quinase converte 1µmol de PEP a piruvato por minuto) e proteína mitocondrial na quantidade de 100 µg.ml<sup>-1</sup>. Após adição do meio de reação e da piruvato quinase, os tubos foram incubados por 10 minutos, a 28°C. A reação foi iniciada pela adição de ATP 4 mmol.l<sup>-1</sup> ( $T_0$ ), e interrompida após 10 minutos pela adição de TCA a 5%. O material foi centrifugado a 10000.g por 1 minuto, sendo então o fosfato inorgânico do

sobrenadante dosado pelo método de SUMNER (1944). A atividade da ATPase foi expressa em  $\mu\text{moles Pi liberado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ .

ESQUEMA 2: SISTEMA REGENERADOR DE ATP



### 3.3.8. Determinação do Inchamento Mitocondrial (*Swelling*)

Os experimentos visando determinar o inchamento mitocondrial foram desenvolvidos em espectrofotômetro Hitashi modelo U-2001 UV/VIS equipado com impressora Epson LX 300, no comprimento de onda de 546 nm.

#### 3.3.8.1. Determinação do Inchamento (*Swelling*) Mitocondrial Sustentado pelo Uso de Substrato Oxidável na Presença de Acetato de Sódio

O aumento do volume mitocondrial, decorrente da entrada de íons sódio na matriz mitocondrial, foi feito de acordo com o método de MUSTAFA *et al.* (1966) modificado. O meio de reação foi constituído de: sacarose 100  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ , Tris-HCl 30  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  (pH 7,5), EDTA 0,5  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ , acetato de sódio 50  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  e 1 mg de proteína mitocondrial, num volume final de 1 ml. O substrato utilizado para promover o inchamento foi o glutamato de sódio 15  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  o qual foi adicionado depois de 2 minutos de incubação das mitocôndrias com a droga. Rotenona 4  $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  foi adicionada ao sistema em momento adequado para observação da contração da organela. Os resultados foram expressos como os traçados representativos de 5 experimentos independentes, e em percentagem de inibição, relativos ao controle.

### 3.3.8.2. Determinação do Inchamento (*Swelling*) Mitocondrial Induzido por Valinomicina em Meio contendo $\text{KNO}_3$ .

O inchamento mitocondrial devido a entrada de potássio na matriz, mediada pela valinomicina foi avaliado de acordo com o método descrito por MORENO & MADEIRA (1990). O meio de reação foi composto de nitrato de potássio  $135 \text{ mmol.l}^{-1}$ , Hepes  $5 \text{ mmol.l}^{-1}$  (pH 7,2), EDTA  $0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$ , rotenona  $2 \text{ }\mu\text{mol.l}^{-1}$ , antimicina A  $2 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ , e 1 mg de proteína mitocondrial, num volume final de 1 ml. A mitocôndria foi incubada por 2 minutos com cada concentração da droga antes da adição de valinomicina  $1,5 \text{ }\mu\text{g}$ , e as variações na absorbância foram acompanhadas em 546 nm. Os resultados foram expressos como os traçados representativos de 4 experimentos independentes, e em percentagem de inibição, relativos ao controle.

### 3.4. DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE DE LIBERAÇÃO DE FERRO PELA FERRITINA PROMOVIDA PELA HISPIDULINA E EUPAFOLINA E DO POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NESTA LIBERAÇÃO.

A determinação da velocidade de liberação do ferro foi realizada espectrofotometricamente segundo o método descrito por OTEIZA *et al.* (1995) variando-se as concentrações da hispidulina. Inicialmente, a ferritina de baço de cavalo foi diluída em tampão Tris-HCl (pH 7,4) contendo NaCl  $140 \text{ mmol.l}^{-1}$  e EDTA  $10 \text{ mmol.l}^{-1}$  e incubada por 1 hora a  $4^\circ\text{C}$ . Em seguida, para remoção do ferro livre a solução foi cromatografada em coluna de Sephadex G-25<sup>®</sup> medium, utilizando como eluente tampão Tris-HCl (pH 7,4) contendo NaCl  $140 \text{ mmol.l}^{-1}$ . A concentração de proteína no eluato foi realizada pelo método de LOWRY *et al.* (1951). A liberação de ferro da ferritina  $0,3 \text{ mg.ml}^{-1}$  na presença ou ausência das diferentes concentrações das drogas foi acompanhada espectrofotometricamente em um sistema de reação contendo tampão Tris-HCl  $20 \text{ mmol.l}^{-1}$  (pH 7,3), NaCl  $140 \text{ mmol.l}^{-1}$  (volume final: 1ml) pelo aumento na absorbância a 530 nm, devido à quelação do  $\text{Fe}^{++}$  pelo sulfato de batofenantrolina  $1 \text{ mmol.l}^{-1}$ . A reação foi acompanhada por 30 minutos. Estas análises também foram realizadas na presença das enzimas antioxidantes superóxido dismutase

40 e 80 U.ml<sup>-1</sup> e catalase 10 e 25 U ml<sup>-1</sup>. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{moles.l}^{-1}$  de Fe<sup>++</sup>, utilizando-se o coeficiente de extinção do complexo Fe<sup>++</sup>/ batofenantrolina de 22.140 M<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup>.

### 3.5. REATIVIDADE ENTRE A HISPIDULINA E O RADICAL LIVRE DIFENILPICRILHIDRAZIL (DPPH)

A reatividade da hispidulina com o radical livre estável DPPH foi determinada através de medidas de alteração da absorbância a 517 nm, de acordo com o método descrito por BLOIS (1958), com algumas modificações. O sistema de reação foi constituído de tampão acetato 100 mmol.l<sup>-1</sup> (pH 5,5), etanol e solução etanólica de DPPH 0,05 mmol.l<sup>-1</sup> num volume final de 1 ml, suplementado em concentrações crescentes de hispidulina e eupafolina até 200  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , visando-se buscar o I<sub>50</sub> dos flavonóides. Após 5 minutos o decréscimo da absorbância foi medido. Concentrações adequadas do agente redutor ácido ascórbico (0,025 a 0,2 mmol.l<sup>-1</sup>) foram utilizadas nos experimentos controle, a título de comparação com o efeito dos flavonóides em estudo.

### 3.6 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS MITOCONDRIAIS

A concentração de proteína foi determinada pelo método de LOWRY *et al.*, (1951), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. As amostras foram lidas em 700 nm contra um branco em espectrofotômetro Hitachi modelo U-2001.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS EXPERIMENTAIS

Os dados experimentais foram expressos como sendo a média dos valores  $\pm$  desvio padrão (média  $\pm$  dp), submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, para a comparação das médias de experimentos independentes. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos por ROCHA (2000)<sup>1</sup> indicam que a hispidulina afeta tanto o consumo de oxigênio quanto a síntese de ATP quando se usa glutamato e succinato como substratos oxidáveis. Sendo assim, algumas hipóteses puderam ser postuladas sobre o mecanismo através do qual a hispidulina estaria inibindo o estado III da respiração mitocondrial, como:

- a) inibição da atividade de complexos enzimáticos e consequentemente restrição parcial no fluxo de elétrons na cadeia respiratória;
- b) efeito sobre a atividade da ATP sintase;
- c) restrição parcial no fornecimento de elétrons à cadeia respiratória por afetar a metabolização do substrato em etapa anterior à cadeia;
- d) alteração da fluidez e/ou integridade da membrana mitocondrial, que afetaria não só o fluxo de elétrons através da cadeia respiratória como a translocação de íons e a síntese acoplada de ATP;
- e) desvio de elétrons da cadeia respiratória de forma direta, através de reações de óxido-redução;
- f) interferência sobre o translocador ADP/ATP
- g) interferência dos carreadores de substrato e fosfato inorgânico

Algumas destas hipóteses foram avaliadas e os resultados serão mostrados a seguir.

Quanto ao estímulo do estado IV, este é característico de agentes desacopladores da fosforilação oxidativa. Esta hipótese será melhor discutida posteriormente.

Inicialmente, com a finalidade de verificar se a hispidulina é capaz de afetar o transporte de elétrons na cadeia respiratória, foram realizadas algumas análises polarográficas na presença e ausência de FCCP, como será mostrado a seguir.

<sup>1</sup> Comunicação pessoal do autor (2000).

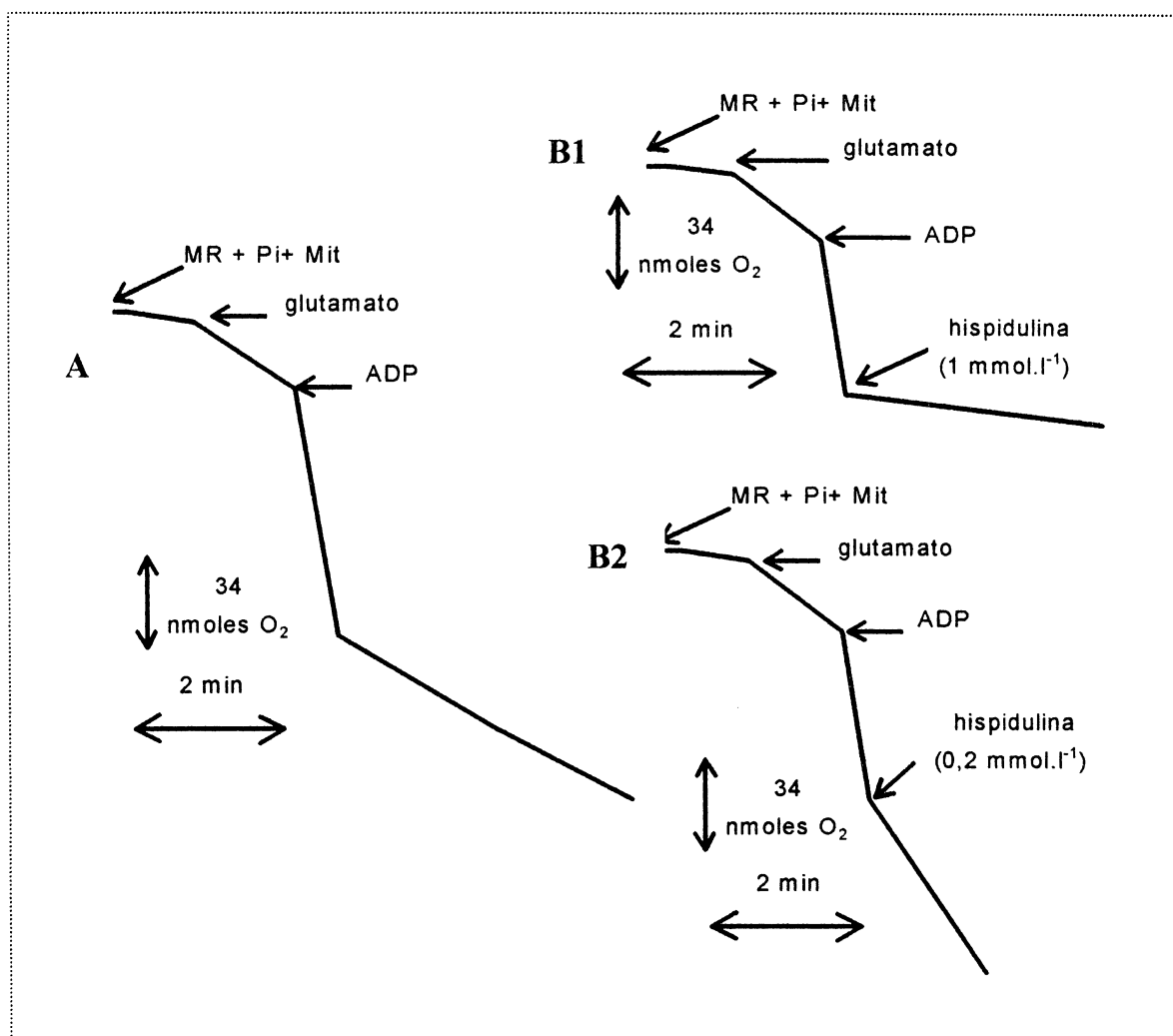
#### 4.1 ANÁLISES POLAROGRÁFICAS PARA CARACTERIZAÇÃO DA HISPIDULINA COMO AGENTE INIBIDOR DO TRANSPORTE DE ELÉTRONS

Segundo MORELAND (1994), os agentes inibidores do transporte de elétrons são caracterizados pela habilidade de interromper o fluxo de elétrons, através da associação com algum dos componentes protéicos dos transportadores de elétrons dos complexos e assim afetar as reações de óxido-redução. Esta capacidade pode ser observada pela inibição do estado III da respiração mitocondrial. Quando o fluxo de elétrons é interrompido, a reação de fosforilação acoplada também é inibida. Existem vários inibidores clássicos que atuam por este mecanismo, como a rotenona e o amital, que atuam sobre o complexo I; o malonato, que competitivamente interfere na oxidação do succinato pela succinato desidrogenase; a antimicina A que afeta o complexo III; o cianeto que inibe o complexo IV, entre outros (MORELAND, 1994).

Observa-se nos traçado B1 e B2 da figura da figura 6 e na tabela 3, que a hispidulina é capaz de inibir fortemente o estado III da respiração mitocondrial nas várias concentrações testadas, sendo este efeito dependente da dose de  $0,2 \text{ mmol.l}^{-1}$  até  $1,0 \text{ mmol.l}^{-1}$ , atingindo-se a partir daí a inibição máxima. Para facilitar a visualização dos efeitos exercidos pela hispidulina, na figura 6 também está representado o traçado do experimento controle (traçado A). Cabe ressaltar que foram realizados experimentos controles com o DMSO, e nas concentrações utilizadas não houve interferência deste solvente. O valor de  $I_{50}$  para a hispidulina para inibição do estado III da respiração mitocondrial se localiza na faixa micromolar, uma vez que até  $50 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$  os efeitos inibitórios foram superiores a 50% (73% de inibição). Esta capacidade de inibição do estado III da respiração mitocondrial pela hispidulina já havia sido observado por ROCHA<sup>1</sup> (2000), porém as situações de incubação com a droga eram distintas. Este resultado observado permite sugerir que o mecanismo de ação da hispidulina seja similar ao dos compostos classificados segundo MORELAND (1994) como *inibidores do transporte de elétrons*.

<sup>1</sup> Comunicação pessoal do autor (2000).

FIGURA 6 – EFEITO DA HISPIDULINA SOBRE A VELOCIDADE RESPIRATÓRIA DO ESTADO III, APÓS A ADIÇÃO DE ADP



Sistema de Reação em volume final de 1,3 ml: D-manitol 125 mmol.l<sup>-1</sup>, KCl 65 mmol.l<sup>-1</sup>, tampão Hepes 10 mmol.l<sup>-1</sup> (pH 7,2), BSA 0,1g%, glutamato de sódio 5 mmol.l<sup>-1</sup>, Pi 1,6 mmol.l<sup>-1</sup>, ADP 0,32 mmol.l<sup>-1</sup> e 2 mg de proteína mitocondrial.

Traçado A: controle (100%); Traçado B1: na presença de hispidulina 1 mol.l<sup>-1</sup>, após adição de ADP, como indicado; Traçado B2: na presença de hispidulina 0,2 mol.l<sup>-1</sup>, após adição de ADP, como indicado. Os traçados são representativos de 3 experimentos independentes, onde a média dos CCR dos experimentos controle foi de 4,0.

TABELA 3 - EFEITOS INIBITÓRIOS DA HISPIDULINA SOBRE A VELOCIDADE RESPIRATÓRIA DO ESTADO III, APÓS A ADIÇÃO DE ADP.

<b>Hispidulina (mmol.l<sup>-1</sup>)</b>	<b>Velocidade de Consumo de Oxigênio no Estado III em Relação ao Controle (%)</b>
<b>0,05</b>	27,12 ± 0,99*
<b>0,1</b>	29,97 ± 5,25*
<b>0,2</b>	25,04 ± 3,18*
<b>0,5</b>	9,34 ± 2,56*
<b>1,0</b>	2,14 ± 0,56*

Sistema de Reação em volume final de 1,3 ml: D-manitol 125 mmol.l<sup>-1</sup>, KCl 65 mmol.l<sup>-1</sup>, tampão Hepes 10 mmol.l<sup>-1</sup> (pH 7,2), BSA 0,1g%, glutamato de sódio 5 mmol.l<sup>-1</sup>, Pi 1,6 mmol.l<sup>-1</sup>, ADP 0,32 mmol.l<sup>-1</sup> e 2 mg de proteína mitocondrial.

Os resultados representam a média ± desvio padrão das triplicatas de 3 experimentos independentes realizados à temperatura de 28°C sendo expressos em percentagens relativas aos controles (100%)

\* Valores estatisticamente significativos relativos ao controle (100%) – p ≤ 0,05.

Para confirmar o efeito de inibidor de transporte de elétrons pela hispidulina, foi realizado um experimento na presença do FCCP, que em baixas concentrações permite alcançar a velocidade máxima de consumo de oxigênio. Como pode ser observado no traçado B da figura 7 em comparação ao controle com FCCP (traçado A), a hispidulina (0,2 mmol.l<sup>-1</sup>) foi capaz de reduzir cerca de 75% a velocidade de consumo de oxigênio, na presença do FCCP. Este resultado pode ser explicado se considerarmos que a hispidulina comporta-se como inibidor do transporte de elétrons, fato que foi demonstrado pelo seu comportamento no traçado B da figura 6. Se este for o seu mecanismo de ação sugere-se que este efeito de diminuir o consumo de oxigênio na presença de FCCP poderia estar ocorrendo devido à interferência da hispidulina sobre as atividades enzimáticas da cadeia respiratória mitocondrial

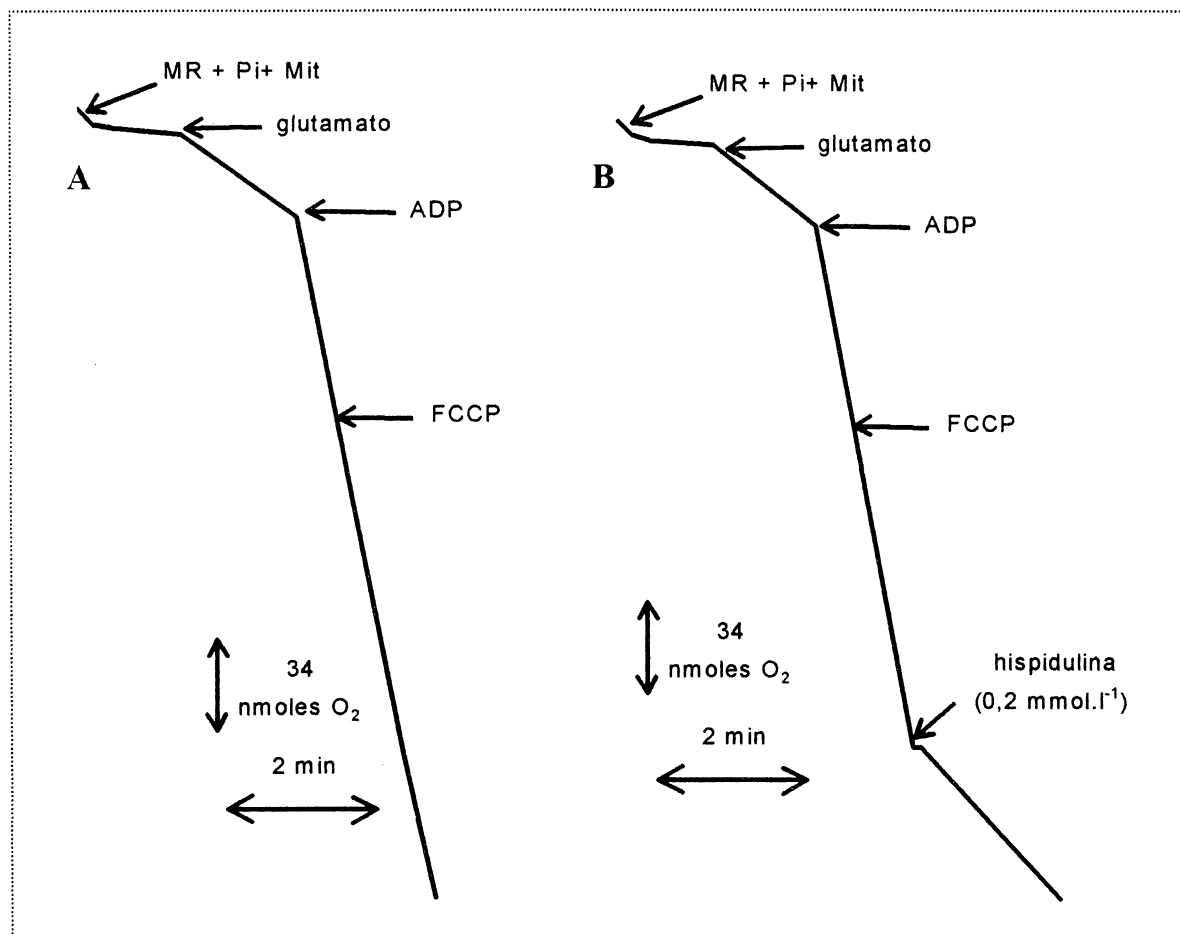


Quanto à possibilidade do envolvimento da hispidulina em reações de óxido-redução, observou-se que a hispidulina é capaz de reduzir o 2,3,5-trifenil-tetrazólio (TFT) (dados não mostrados), um aceitador artificial de elétrons que pode reoxidar flavoproteínas como a succinato desidrogenase (SMITH, 1951).

Outros flavonóides como a morina, mirecitina, luteolina e quercetina podem sofrer reações de óxido-redução (HODNICK *et al.*; 1986).

Recentemente, utilizando a técnica eletroquímica de voltametria cíclica, outros colaboradores do nosso laboratório já observaram que a hispidulina sofre oxidação irreversível na região de potencial entre 480 e 620 mV vs ECS, apresentando dois processos de transferência de carga (LIMA, 2001).

FIGURA 7 – EFEITO DA HISPIDULINA SOBRE A VELOCIDADE RESPIRATÓRIA DO ESTADO III NA PRESENÇA DO DESACOPLADOR FCCP



Sistema de Reação em volume final de 1,3 ml: D-manitol 125 mmol.l<sup>-1</sup>, KCl 65 mmol.l<sup>-1</sup>, tampão Hepes 10 mmol.l<sup>-1</sup> (pH 7,2), BSA 0,1g%, glutamato de sódio 5 mmol.l<sup>-1</sup>, Pi 1,6 mmol.l<sup>-1</sup>, ADP 0,32 mmol.l<sup>-1</sup> e 2 mg de proteína mitocondrial.

Traçado A: controle respiratório obtido na presença de FCCP (100%); Traçado B: redução do consumo de oxigênio na presença do desacoplador FCCP pela hispidulina 0,2 mol.l<sup>-1</sup>, conforme indicado.

Os traçados são representativos de 3 experimentos independentes, onde a média dos CCR dos experimentos controle na ausência de FCCP foi de 4,4.

Os resultados até então apresentados, quando analisados juntamente com os resultados obtidos por ROCHA (2000)<sup>1</sup> indicam a possibilidade da hispidulina poder interferir sobre as atividades enzimáticas da cadeia respiratória, hipótese que foi avaliada na sequência de nossos experimentos e será demonstrada a seguir.

<sup>1</sup> Comunicação pessoal do autor (2000).

#### 4.2 EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE AS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS RELACIONADAS À CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL

Os efeitos inibitórios da hispidulina sobre o consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas sugerem que este flavonóide poderia interferir em atividades enzimáticas da cadeia respiratória, bem como possuir propriedade desacopladora. Com a finalidade de verificar a primeira possibilidade avaliamos os efeitos promovidos pela hispidulina sobre tais complexos enzimáticos relacionados com a cadeia respiratória, e os resultados obtidos estão resumidos na tabela 4.

Como pode ser observado, a hispidulina promoveu inibições estatisticamente significativas em todas as doses testadas (0,05, 0,075, 0,1, 0,15, e 0,2 mmol.l<sup>-1</sup>) sobre a atividade da NADH oxidase, NADH citocromo *c* redutase e NADH desidrogenase. Sobre a atividade da succinato oxidase observou-se inibições estatisticamente significativas com as doses de 0,075, 0,1, 0,15, e 0,2 mmol.l<sup>-1</sup> de hispidulina, e apenas as doses de 0,1, 0,15, e 0,2 mmol.l<sup>-1</sup> foram capazes de inibir de forma estatisticamente significativa a atividade da succinato citocromo *c* redutase. Não observou-se alteração nas atividades enzimáticas da succinato desidrogenase e citocromo *c* oxidase com nenhuma das doses utilizadas.

Quando foram realizados controles na presença de DMSO (20 µl) observou-se 20% de inibição sobre a atividade da NADH oxidase e 16% de redução da atividade da NADH citocromo *c* redutase. Estes valores foram descontados dos percentuais de inibição obtidos com a hispidulina que foi dissolvida em DMSO. Para as demais enzimas não foram observadas diferenças significativas entre os controles na presença e ausência de DMSO.

A inibição da NADH oxidase (40%) observada com hispidulina (0,2 mmol.l<sup>-1</sup>) é similar aos valores de inibição do consumo de oxigênio no estado III utilizando glutamato como substrato oxidável observado para a mesma dose de hispidulina (ROCHA, 2000<sup>1</sup>), o que sugere que este declínio observado no consumo de oxigênio

<sup>1</sup> Comunicação pessoal do autor (2000).

possa ser pelo menos em parte resultante das inibições das atividades das enzimas da cadeia respiratória.

Quando se considera a utilização de succinato como substrato oxidável, em que se avalia apenas parte da cadeia respiratória, os resultados obtidos com a hispidulina ( $0,2 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) sobre a velocidade de consumo de oxigênio no estado III (26%) (ROCHA, 2000<sup>1</sup>), foram próximos às inibições observadas sobre a atividade da succinato oxidase (18%).

Através destes resultados ainda é possível apontar o provável sítio da ação da hispidulina, considerando a soma das inibições dos segmentos I ao III da cadeia respiratória (avaliados pelas atividades da NADH citocromo *c* redutase, succinato citocromo *c* redutase, NADH desidrogenase e succinato desidrogenase) obteve-se também cerca de 40% de inibição com a maior dose testada de hispidulina ( $0,2 \text{ mmol.l}^{-1}$ ), e ainda, entre os complexos III e IV não observou-se inibição estatisticamente significativa, assim, é possível sugerir que a hispidulina atue entre os complexos I e III da cadeia respiratória mitocondrial.

Em relação aos critérios estruturais anteriormente discutidos, a hispidulina por apresentar dupla ligação entre C-2 e C-3 e o grupo ceto em C-4, atende boa parte dos requisitos estruturais apontados como necessários para inibição das enzimas mitocondriais NADH oxidase e succinato oxidase (HODNICK *et al.*, 1987; BOHMONT *et al.*, 1987), por isso, as inibições obtidas no presente trabalho pela hispidulina sobre a atividade destas enzimas podem ser reflexo destas características estruturais, que é comum a todas as moléculas da classe das flavonas.

Ainda considerando as inibições enzimáticas observadas, segundo HAVSTEEN (1983), é bastante conhecida a interferência dos flavonóides com enzimas óxido-redutases, o que se deve à sua grande propensão de doar elétrons, processo geralmente acompanhado pela abertura do anel  $\gamma$ -pirona (anel C).

<sup>1</sup> Comunicação pessoal do autor (2000).

TABELA 4- EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE AS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS RELACIONADAS COM A CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL

<i>ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM % RELATIVOS AO CONTROLE (100%)</i>							
<b>Hispidulina (mmol.l<sup>-1</sup>)</b>	<b>NADH Oxidase</b>	<b>NADH Citocromo <i>c</i> Redutase</b>	<b>NADH Desidrogenase</b>	<b>Succinato Oxidase</b>	<b>Succinato Citocromo <i>c</i> Redutase</b>	<b>Succinato Desidrogenase</b>	<b>Citocromo <i>c</i> Oxidase</b>
<b>0,05</b>	90,0 ± 6,9*	86,5 ± 12,5*	89,53 ± 6,62*	98,35 ± 6,5	92,55 ± 7,4	101,5 ± 7	96,23 ± 4,4
<b>0,075</b>	77,55 ± 7,7*	82,7 ± 10,6*	88,44 ± 8,0*	96,44 ± 5,4*	93,95 ± 6,4	98,09 ± 3,4	93,23 ± 8,3
<b>0,1</b>	71,19 ± 7,5*	83,06 ± 13,3*	87,76 ± 6,8*	91,12 ± 4,6*	81,94 ± 8,4*	98,94 ± 6,7	97,09 ± 4,8
<b>0,15</b>	59,89 ± 5,0*	70,0 ± 9,11*	85,76 ± 8,2*	88,75 ± 3,0*	83,45 ± 7,8*	95,41 ± 4,8	98,49 ± 5,9
<b>0,2</b>	57,07 ± 3,8*	59,9 ± 5,9*	84,4 ± 7,9*	82,12 ± 4,9*	78,2 ± 8,3*	92,47 ± 7	96,78 ± 6,0

As condições experimentais estão descritas no item 3.3.5 da seção 3. Materiais e Métodos.

100% corresponde à atividade dos controles: NADH oxidase: 22,2 nmol de oxigênio consumido .min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial; NADH citocromo *c* redutase: 14,44nmol de citocromo *c* reduzido .min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial; NADH desidrogenase: 220 μmol de ferricianeto reduzido .min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial; Succinato Oxidase: 20 nmol de oxigênio consumido .min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial; Succinato citocromo *c* redutase: 40 nmol de citocromo *c* reduzido .min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial; Succinato desidrogenase: 258 μmol de oxigênio consumido .min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial; Citocromo *c* oxidase: 145,36 μmol de oxigênio consumido .min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial Os resultados estão representados como média ± desvio padrão das triplicatas 4 experimentos independentes.

\* Valores com diferenças estatisticamente significativas relativas ao controle (100%) – p ≤ 0,05.

Um aspecto interessante a ser destacado é que a rotenona, um clássico inibidor do transporte de elétrons, é um isoflavonóide com dupla ligação entre C-2 e C-3 reduzida. As isoflavonas são isômeros das flavonas e são formadas biossinteticamente presumivelmente pela migração de um grupo aril do mesmo precursor chalcona, sendo este processo controlado por uma enzima (HARBONE *et al.*; 1967). Sendo a rotenona um aparentado químico da classe das flavonas, à qual pertence a hispidulina, é sugestivo que ambas atuem sobre o metabolismo mitocondrial através de mecanismos similares.

Embora tenha sido sugerido que a hispidulina e a rotenona atuem por mecanismos semelhantes, ou seja, como *inibidores do transporte de elétrons*, os resultados obtidos nos diferentes trechos estudados da cadeia respiratória indicam que o sítio de atuação da hispidulina é distinto da rotenona, pois os efeitos inibitórios da hispidulina ocorreram além do complexo I, como acima discutido.

Estes resultados tornam-se importantes porque FIGUERAS *et al.* (1973) e HODNICK *et al.* (1987) sugerem que a inibição de enzimas mitocondriais por flavonóides podem estar relacionadas com sua citotoxicidade e outros efeitos biológicos, eles sugerem também que estas moléculas podem ser alvo de estudo na terapia anticâncer, podendo explicar pelo menos em parte os efeitos antineoplásicos verificados para a hispidulina em vários trabalhos.

Considerando que a quercetina, um flavonol com padrão de hidroxilação semelhante ao da hispidulina, além de inibir atividades enzimáticas da cadeia respiratória entre os complexos I e III (HODNICK *et al.*; 1987), mostrou-se também capaz de inibir a atividade ATPase de mitocôndrias (CARPENEDO *et al.*; 1969), a próxima hipótese avaliada foi a do efeito da hispidulina sobre a atividade da ATPase .

#### 4.3 EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE O COMPLEXO $F_1F_0$ - ATPase

Para melhor entendimento das ações da hispidulina sobre as atividades ligadas à produção de ATP, seu efeito foi avaliado sobre a atividade da  $F_1F_0$  - ATPase (ATP sintase). Neste complexo enzimático o complexo  $F_0$ , constituído de polipeptídios hidrofóbicos, se encontra inserido na membrana mitocondrial interna, sendo responsável pela captação de prótons do espaço intermembranas e sua liberação na matriz mitocondrial. O componente solúvel  $F_1$ , inclui 5 tipos de subunidades ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta$  e  $\epsilon$ ), na estequiometria de  $3\alpha:3\beta:1\gamma:1\delta:1\epsilon$ , sendo este componente responsável pela síntese de ATP – por ocasião do transporte de elétrons e passagem de prótons pelo componente  $F_0$  – ou hidrólise de ATP, em presença do nucleotídeo adenina e ausência de substratos para a cadeia respiratória (NICHOLLS & FERGUSON, 1992). A interação entre  $F_1$  e  $F_0$  é garantida por outros dois componentes:  $F_6$  e OSCP, sendo que esta última confere sensibilidade à oligomicina. Estas proteínas associam-se aos componentes  $F_1$  e  $F_0$  do complexo enzimático, auxiliando a regular a permeabilidade da membrana mitocondrial interna a prótons e garantindo a eficiência da fosforilação oxidativa (TZAGOLOFF, 1982).

De acordo com a teoria quimiosmótica (MITCHELL, 1961), o transporte de elétrons através da cadeia respiratória leva à formação da força próton-motriz ( $\Delta p$ ), gradiente eletroquímico de prótons através da membrana mitocondrial interna. A utilização deste gradiente pela ATP sintase está acoplada à síntese de ATP, uma vez que nesta situação os prótons só podem retornar à matriz mitocondrial através do componente  $F_0$  do complexo enzimático. Entretanto, existem agentes químicos, definidos como desacopladores, que impedem a utilização do potencial eletroquímico de prótons derivado do transporte de elétrons para a fosforilação do ADP em ATP. Assim, agentes desacopladores, protonóforos, translocadores de prótons, substâncias que aumentam a condutância de prótons através da membrana desfazem o gradiente eletroquímico, dissipando a força próton-motriz e impedindo a síntese de ATP (NICHOLLS & FERGUSON, 1992). A entrada de prótons na matriz mitocondrial, faz ainda com que o componente  $F_1$  do complexo enzimático passe a hidrolisar ATP, o

que ocorre com a extrusão simultânea de prótons , através do complexo  $F_0$ . Desta forma, a atividade ATPásica é muito baixa em mitocôndrias acopladas, e aumenta na presença de desacopladores clássicos como o FCCP.

Desta forma, a avaliação da atividade da ATPase mitocondrial permite verificar a influência da droga sobre a enzima (em mitocôndrias rompidas) ou sobre a permeabilidade da membrana a prótons (em mitocôndrias intactas), bem como seu eventual efeito desacoplador, além de colaborar para explicar os resultados obtidos na investigação dos efeitos da hispidulina sobre a respiração mitocondrial.

No presente estudo foram avaliados os efeitos da hispidulina sobre a atividade ATPásica em mitocôndrias de fígado de rato intactas, rompidas por congelamento e descongelamento em mitocôndrias intactas tratadas com FCCP (tabela 5).

Como pode ser observado, a hispidulina em todas as doses testadas foi capaz de inibir de forma estatisticamente significativa a atividade da ATPase em mitocôndrias rompidas em aproximadamente 20%, o que indica a interferência direta deste flavonóide sobre este complexo enzimático, situação que se torna facilitada pelo fato de não estar presente a barreira da membrana mitocondrial.

Em contraste, observou-se um grande estímulo dose-dependente pela hispidulina sobre a atividade da ATPase quando utilizou-se preparação de mitocôndrias intactas, que ultrapassou 100% com a dose máxima testada (0,2 mmol.l<sup>-1</sup>). Este efeito é característico dos agentes desacopladores (TZAGOLOFF, 1982), hipótese que se reforça quando aliada ao fato da hispidulina ter promovido estímulo do estado IV da respiração mitocondrial. Este efeito desacoplador da hispidulina será melhor discutido posteriormente.



Considerando os estudos de estrutura x função amplamente discutidos na introdução deste trabalho, os resultados obtidos com a hispidulina sobre a atividade da ATPase estão em concordância com os resultados de SANTOS *et al.* (1998), que sugeria a necessidade de substituições OH nas posições 5 e 7 nas moléculas de flavonóides para o efeito sobre a síntese de ATP.

A quercetina, que inibe a atividade ATPásica e altera o transporte de elétrons, inibindo as atividades enzimáticas da NADH e succinato oxidase, como comentado anteriormente; afeta atividades dependentes de um arranjo estrutural definido das membranas biológicas, efeitos ocorridos provavelmente devido à sua interação com componentes mais hidrofóbicos da membrana (CARPENEDO *et al.*; 1969)

Quando na presença do desacoplador clássico FCCP, a hispidulina, em todas as doses testadas, foi incapaz de provocar qualquer efeito sobre a atividade da ATPase em mitocôndrias intactas, o que pode excluir a possibilidade da hispidulina estar atuando indiretamente sobre o translocador de nucleotídeos adenina ( $\text{ADP}^{+3}/\text{ATP}^{+4}$ ).

TABELA 5 – EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE O COMPLEXO  $F_1F_0$  – ATPase DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO.

<b>Hispidulina (mmol.l<sup>-1</sup>)</b>	<b>ATPase com Mitocôndria Rompida (%) de atividade</b>	<b>ATPase com Mitocôndria Intacta (%) de atividade</b>	<b>ATPase com Mitocôndria Intacta e FCCP (%) de atividade</b>
<b>0,05</b>	82,55±8,1*	144,4±8,6*	97,11±7,9
<b>0,075</b>	79,62±8,7*	171,3±18,5*	98,97±2,6
<b>0,1</b>	88,56±9,6*	167,8±18,6*	98,97±4,9
<b>0,15</b>	77,46±7,7*	181,5±19,9*	99,61±6,0
<b>0,2</b>	74,88±7,5*	207,23±22,2*	95,46±7,9

Sistema de Reação em volume final de 1 ml:

Mitocôndrias Rompidas: tampão Tris-HCl 10 mmol.l<sup>-1</sup> (pH 7,4), MgSO<sub>4</sub> 3 mmol.l<sup>-1</sup>, PEP 2,5 mmol.l<sup>-1</sup>, piruvato quinase 3 unidades e 100 µg de proteína mitocondrial. A reação foi iniciada pela adição de ATP 4 mmol.l<sup>-1</sup> e interrompida após 10 minutos pela adição de TCA a 5%. 100% corresponde a 466,87±50 nmol de Pi liberado .min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial

Mitocôndrias Intactas: sacarose 50 mmol.l<sup>-1</sup>, tampão Tris-HCl 10 mmol.l<sup>-1</sup> (pH 7,4), KCl 50 mmol.l<sup>-1</sup>, e 2 mg de proteína mitocondrial. A reação foi iniciada pela adição de ATP 3 mmol.l<sup>-1</sup> e mantida sob agitação constante a 30°C. Após 10 minutos a reação foi interrompida pela adição de TCA a 10%. 100% corresponde a 22,17±6,32 nmol de Pi liberado .min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial;

Mitocôndrias Intactas e desacopladas por FCCP: sacarose 50 mmol.l<sup>-1</sup>, tampão Tris-HCl 10 mmol.l<sup>-1</sup> (pH 7,4), KCl 50 mmol.l<sup>-1</sup>, FCCP 1 µmol.l<sup>-1</sup> e 2 mg de proteína mitocondrial. A reação foi iniciada pela adição de ATP 3 mmol.l<sup>-1</sup> e mantida sob agitação constante a 30°C. Após 10 minutos a reação foi interrompida pela adição de TCA a 10%. 100% corresponde a 71,14±4 nmol de Pi liberado .min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial.

Os resultados representam a média ± desvio padrão das quadruplicatas de 4 experimentos independentes realizados à temperatura de 28°C sendo expressos em percentagens relativas aos controles (100%)

\* Valores estatisticamente significativos relativos ao controle (100%) –  $p \leq 0,05$ .

Na sequência serão avaliados os efeitos da hispidulina sobre parâmetros relacionados à fluidez e elasticidade da membrana mitocondrial.

#### 4.4 EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL

Uma suspensão mitocondrial é turva e produz dispersão da luz. Esta dispersão é função da diferença do índice de refração entre o conteúdo da matriz e o meio; qualquer processo que diminua esta diferença, como por exemplo o aumento no volume da matriz pelo influxo de solutos permeáveis, resultaria num decréscimo da dispersão da luz com o índice de refração da matriz aproximando-se do meio (NICHOLLS & FERGUSON, 1992).

O transporte de cátions e ânions através da membrana mitocondrial interna produz alterações osmóticas, que induzem o fluxo de água, que resulta em mudanças no volume da matriz. Este fenômeno osmótico de entumescimento ou inchamento (“*swelling*”) das mitocôndrias é possível devido à elasticidade da membrana mitocondrial interna. Isto ocorre devido ao desdobramento das cristas desta membrana, o que permite o aumento considerável do volume da matriz, sem entretanto causar o rompimento da organela (NICHOLLS & FERGUSON, 1992).

Algumas formas de ocorrerem mudanças no volume da matriz mitocondrial provenientes de alterações osmóticas que induzem o fluxo da água, seria através da entrada de íons permeantes na matriz mitocondrial, onde o inchamento seria dependente do potencial elétrico gerado (MUSTAFA *et al.*, 1966), ou mesmo através da entrada de íons na presença de um ionóforo, como por exemplo o  $K^+$  na presença de valinomicina (TZAGOLOFF, 1982; NICHOLLS & FERGUSON, 1992).

Devido às características físicas da hispidulina, especialmente sua hidrofobicidade, e sua semelhança estrutural com o anel da estrutura da ubiquinona, que é naturalmente encontrada na membrana mitocondrial, espera-se sua maior penetração na fase lipídica de membranas, fato que se observa com outros flavonóides, como a quercetina (CARPENEDO *et al.*, 1969). Para verificar a hipótese da hispidulina poder afetar parâmetros relacionados com a elasticidade e permeabilidade da membrana, foram realizados experimentos de inchamento mitocondrial com mitocôndrias não energizadas e energizadas pela oxidação de substrato.

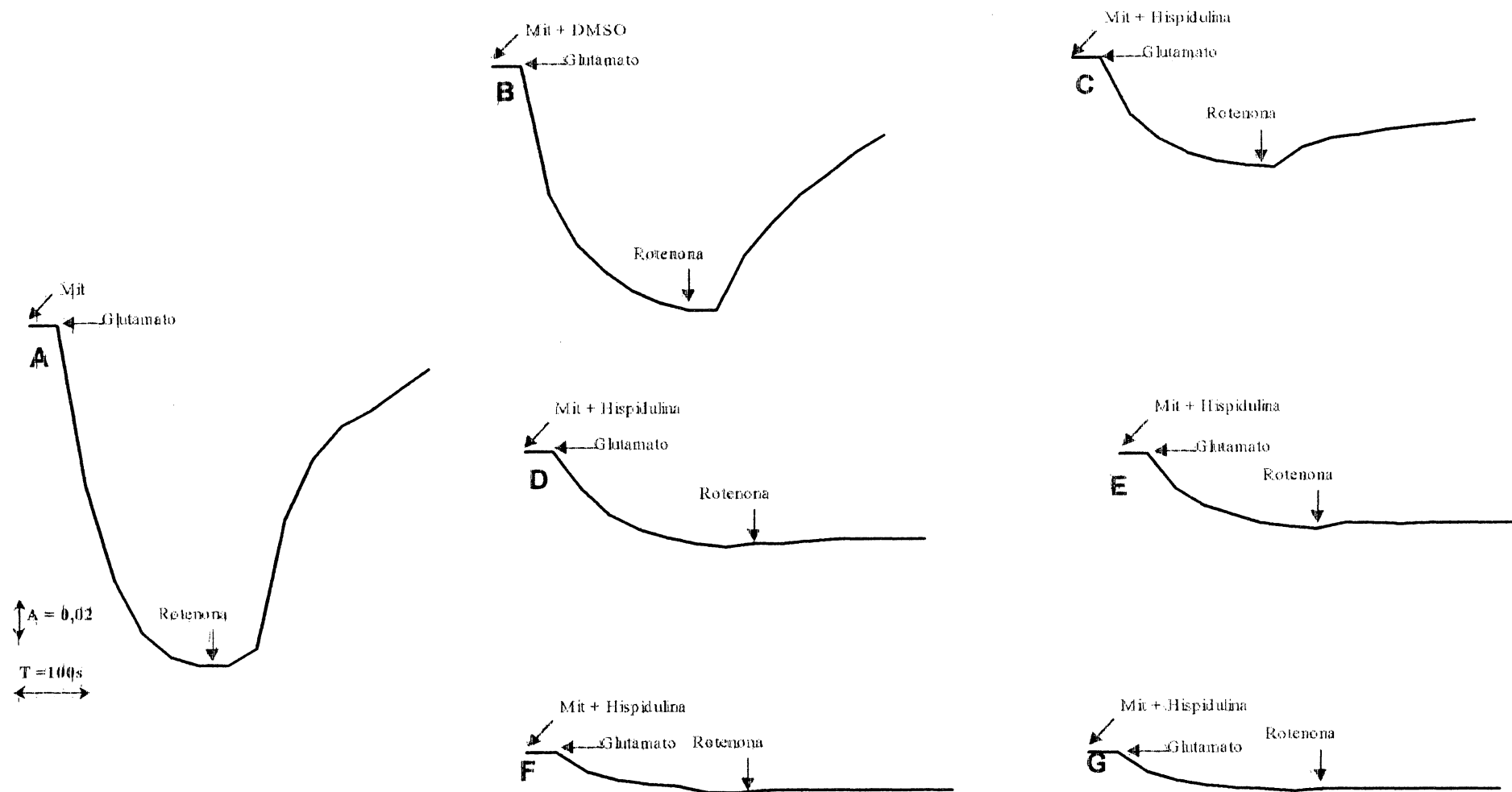
#### 4.4.1 Efeitos da Hispidulina sobre o Inchamento de Mitocôndrias Energizadas

O traçado A da figura 8 mostra um experimento típico de inchamento mitocondrial utilizando glutamato de sódio como substrato na presença de acetato de sódio. Nas condições de incubação apropriadas, e em presença de acetato de sódio, a adição do glutamato desencadeou o aumento do volume mitocondrial, que se observa pelo decréscimo da absorbância. A reversão deste inchamento mitocondrial foi induzida pela rotenona.

Nos traçados C a F da figura 8, a hispidulina em diferentes concentrações foi incubada por dois minutos com as mitocôndrias em meio contendo acetato de sódio, antes da adição do glutamato. O mesmo procedimento foi realizado para o solvente da hispidulina, o DMSO, adicionando-se volumes idênticos aos utilizados em cada concentração de hispidulina, que foi de no máximo 20  $\mu$ l. Observou-se inibições “per si” promovidas pelo solvente DMSO (20 $\mu$ l), sobre a amplitude (32%) e velocidade inicial do inchamento (22,8%) bem como sobre a amplitude da contração mitocondrial (44,2%) e velocidade da contração (64%), como pode ser observado no traçado B da figura 8.

Observa-se que a hispidulina, em todas as concentrações testadas (figura 8), reduziu de forma bastante acentuada o inchamento da organela, sendo que tanto a velocidade inicial quanto a amplitude total do inchamento tiveram reduções de aproximadamente 90% com a dose máxima utilizada (0,2 mmol.l<sup>-1</sup>). Sobre a amplitude da contração induzida por rotenona a inibição foi quase total, bem como para a velocidade inicial da contração, com a dose máxima de 0,2 mmol.l<sup>-1</sup>. Os resultados mostram que tanto a velocidade quanto a amplitude do inchamento e da contração foram afetadas pela droga, sugerindo que a hispidulina pode alterar tanto a permeabilidade da membrana mitocondrial ao Na<sup>+</sup> quanto a sua elasticidade.

**FIGURA 8— EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE O INCHAMENTO DE MITOCÔNDRIAS ENERGIZADAS NA PRESENÇA DE ACETATO DE SÓDIO**



Sistema de Reação em volume final de 1 ml: sacarose 100 mmol.l<sup>-1</sup>, Tris-HCl 30 mmol.l<sup>-1</sup>, EDTA 0,5 mmol.l<sup>-1</sup>, acetato de sódio 50 mmol.l<sup>-1</sup> e 1 mg de proteína mitocondria suplementado com glutamato de sódio 15 mmol.l<sup>-1</sup> e rotenona 4 μmol.l<sup>-1</sup>, adicionada aos experimentos no tempo de 300 segundos, conforme indica a seta, para observação da contração da organela. A mitocôndria com ou sem a adição da droga e do DMSO foi incubada por 2 minutos, antes da adição do glutamato. Os traçados são representativos de 5 experimentos independentes. A hispidulina estava presente nas concentrações: C- 0,05; D-0,075; E-0,1; F-0,15; G-0,2 mmol.l<sup>-1</sup>. No traçado B o DMSO (20 μl) estava presente.

Os efeitos produzidos pela hispidulina sobre o inchamento mitocondrial podem ser interpretados em parte como consequência das inibições por ela provocadas sobre as atividades enzimáticas da cadeia respiratória observadas anteriormente, reduzindo o fluxo de elétrons e consequentemente o inchamento decorrente da energização por glutamato. Contudo, cabe ressaltar que parte dos valores obtidos podem ser atribuídos aos efeitos do DMSO sobre os parâmetros analisados, não podendo ser descartada a possibilidade de um efeito sinérgico sobre a membrana, o que justificaria os valores maiores de inibição.

Segundo HAVSTEEN (1983), já é bastante conhecida a interferência dos compostos flavonóides sobre membranas naturais, fenômeno explicado em parte por inibições enzimáticas sobre ATPases e outras enzimas, como fosfolipase A<sub>2</sub>, lipooxigenase, entre outras, além das características de lipofilicidade.

#### 4.4.2 Efeitos da Hispidulina sobre o Inchamento Mitocondrial Induzido por Valinomicina na Presença de Nitrato de Potássio

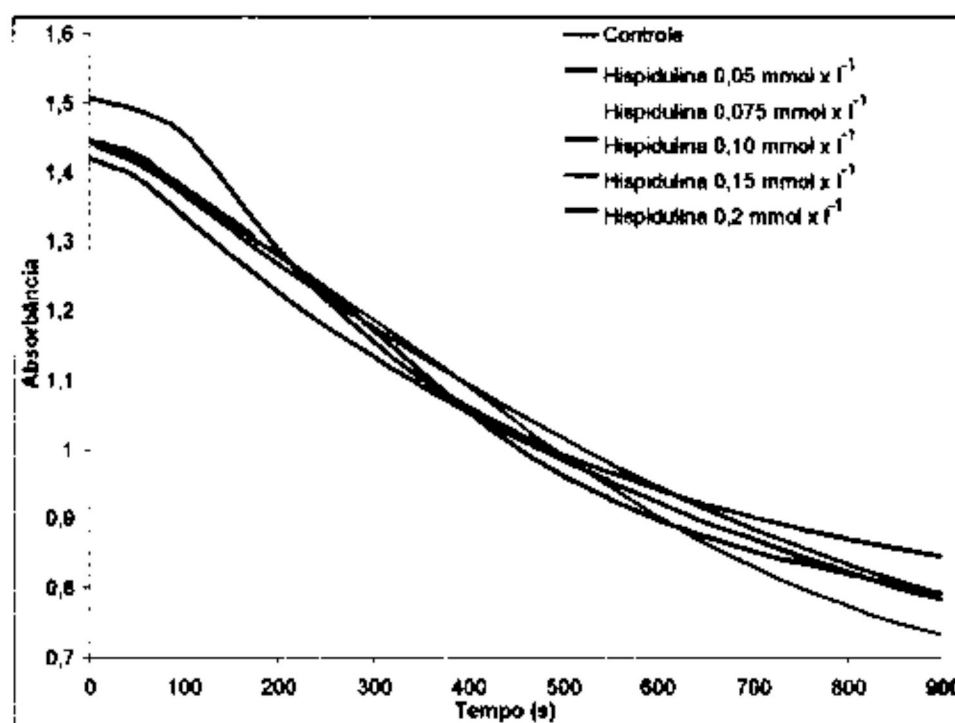
A avaliação do inchamento de mitocôndrias desenergizadas é importante porque descarta a interferência da hispidulina sobre alvos enzimáticos da cadeia respiratória, o que poderia restringir o inchamento, como verificado anteriormente (figura 6).

Mitocôndrias intactas, na ausência de substrato oxidável, são pouco permeáveis ao íon  $K^+$ . Segundo PRESSMAN (1976), esta restrição à passagem do  $K^+$  ocorre porque os componentes fosfolipídicos da membrana tornam desfavorável a passagem deste cátion pela matriz mitocondrial. Esta permeabilidade pode ser aumentada pela adição do ionóforo valinomicina, um carreador móvel que catalisa também o transporte de  $Cs^+$ ,  $Rb^+$  e  $NH_4^+$  (PRESSMAN, 1976; TZAGOLOFF, 1982; NICHOLLS & FERGUSON, 1992). Por não apresentar carga, nem resíduos ionizáveis, a valinomicina adquire a carga do íon, que se encontra complexado no centro polar da molécula. Tanto a forma complexada quanto a não complexada conseguem transitar pela membrana mitocondrial (NICHOLLS & FERGUSON, 1992), logo, a formação deste complexo lipossolúvel reduz a necessidade energética para o transporte, facilitando a transferência do  $K^+$  através da membrana mitocondrial interna. A velocidade do transporte de  $K^+$  é determinada pela rapidez com que o complexo se move na bicamada lipídica, sendo esta mobilidade dependente da fluidez da membrana (TZAGOLOFF, 1982). O complexo sofre dissociação e o  $K^+$  é liberado na matriz mitocondrial. A entrada do  $K^+$  cria uma variação de potencial positivo dentro da organela que faz com que íons negativos permeáveis como o  $NO_3^-$  entrem, ocasionando a entrada de água e promovendo então o inchamento. Portanto, no inchamento mitocondrial induzido pela adição de valinomicina e sal de potássio, a velocidade e a amplitude deste inchamento indicam a velocidade do transporte de  $K^+$  (TZAGOLOFF, 1982).

Os resultados da figura 9 mostram que a hispidulina em todas as doses testadas foi incapaz de interferir de forma estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) na amplitude e velocidade do inchamento mitocondrial nas condições experimentais propostas. Este resultado sugere, indiretamente, que a hispidulina e mesmo o DMSO possivelmente não estariam interferindo de forma estatisticamente significativa na fluidez da membrana da organela e no transporte de  $K^+$  na presença de valinomicina. Contudo, estes resultados confirmam a inibição da cadeia respiratória como causadora das inibições do inchamento de mitocôndrias energizadas (figura 8). Entretanto, não podemos descartar totalmente esta possibilidade, sendo necessárias análises complementares de polarização de fluorescência, usando sondas fluorescentes apropriadas para a região hidrofóbica da membrana (sonda DPH) e para a região superficial da mesma, que possui caráter mais hidrofílico (sonda DPH-PA) para poder-se tirar conclusões definitivas a respeito da interferência da hispidulina sobre a fluidez da membrana.



FIGURA 9 – EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL INDUZIDO POR VALINOMICINA, NA PRESENÇA DE NITRATO DE POTÁSSIO, UTILIZANDO MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO DESENERGIZADAS.



Sistema de Reação:  $\text{KNO}_3$   $135 \text{ mmol.l}^{-1}$ , tampão Hepes  $5 \text{ mmol.l}^{-1}$  (pH 7,4), EDTA  $0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$ , rotenona  $4 \text{ }\mu\text{mol.l}^{-1}$ , antimicina A  $2 \text{ }\mu\text{g/ml}$ ,  $1 \text{ mg}$  de proteína mitocondrial e hispidulina nas concentrações indicadas pela legenda, em volume final de  $1 \text{ ml}$ .

A reação foi iniciada pela adição de valinomicina  $4 \text{ }\mu\text{g/ml}$ .

Os traçados são representativos de 3 experimentos independentes.

#### 4.5 EFEITOS DA HISPIDULINA E EUPAFOLINA SOBRE A LIBERAÇÃO DE FERRO DA FERRITINA

A ferritina é uma proteína muito estudada, amplamente distribuída na natureza, que possui 24 subunidades, havendo seu interior uma grande quantidade de ferro armazenado como hidróxido de ferro ligado e fosfato (FORD *et al.*, 1984; WATT *et al.*, 1985).

A ferritina, como uma proteína armazenadora de ferro, é uma molécula chave no metabolismo deste metal. Ela mantém o ferro sob uma forma facilmente mobilizável no momento e local necessário (FUNK *et al.*, 1985), evitando que este ferro fique livre para envolver-se em reações geradoras de espécies reativas de oxigênio. Portanto, a ferritina contribui para a proteção da célula contra a toxicidade envolvendo EROS (espécies reativas de oxigênio). Contudo, o  $\text{Fe}^{+3}$  da ferritina pode ser reduzido por vários radicais como ânion superóxido, semiquinona, ou por outras moléculas, como a 6-hidroxi-dopamina (MONTEIRO *et al.*, 1989; BANDY *et al.*, 1987) ou o ácido 5-aminolevulínico (OTEIZA *et al.*, 1995). Sendo assim, o ferro liberado na forma de  $\text{Fe}^{+2}$ , pode envolver-se em reações de geração de espécies reativas de oxigênio, promovendo injúria oxidativa (ROCHA *et al.*, 2000). Esta mobilização inadequada do ferro pode levar à lipoperoxidação, ao dano oxidativo de proteínas e do DNA e, possivelmente desempenhar importante papel na carcinogênese ferro-induzida (TOYOKUNI, 1996).

Considerando a estrutura química dos dois flavonóides estudados (hispidulina e eupafolina), acredita-se que ambas as moléculas sejam capazes de liberar o ferro da ferritina em proporções diferentes, isto porque, como já relatado anteriormente, a eupafolina possui o anel catecol, presente em outras moléculas liberadoras de ferro, como a 6-OH dopamina (MONTEIRO *et al.*, 1989). Como pode ser observado nas figuras 10 e 11, tanto a hispidulina quanto a eupafolina são capazes de liberar o ferro da ferritina, sendo estes efeitos não proporcionalmente dependentes da dose. Os efeitos foram mais acentuados para a eupafolina (0,2 mmol.l<sup>-1</sup>) que chegou a liberar até 3,5

μmoles de ferro, enquanto a hispidulina (0,2 mmol.l<sup>-1</sup>) liberou até 1,2 μmoles de ferro nas mesmas condições experimentais em 30 minutos. Cabe ressaltar que foram feitos controles com o DMSO, contudo o solvente não interferiu nos resultados nos volumes utilizados.

A maior liberação de ferro pela eupafolina quando comparado à hispidulina confirma a maior capacidade liberadora deste metal com compostos como a 6-hidroxidopamina, que também possuem anel catecol e são capazes de liberar ferro da ferritina através da geração de espécies reativas de oxigênio (MONTEIRO *et al.*, 1989).

A fim de verificar se o processo de liberação de ferro da ferritina estava sendo induzido pela presença de espécies reativas de oxigênio, ensaios foram conduzidos na presença das enzimas antioxidantes catalase e SOD, em diferentes concentrações. No caso da hispidulina (0,2 mmol.l<sup>-1</sup>), a liberação de ferro da ferritina não foi reduzida de maneira estatisticamente significativa tanto na presença de catalase (10 e 25 U) quanto de SOD (40 e 80 U) (dados não mostrados). Entretanto para a eupafolina (0,2 mmol.l<sup>-1</sup>), verificou-se drástica redução de cerca de 75% na liberação de ferro da ferritina na presença de 25 U de catalase, sendo que a quantidade de ferro total liberado pode ser estatisticamente considerada igual ao controle sem adição do flavonóide (figura 12). Na presença de 10 U de catalase, a redução na liberação de ferro em relação ao controle sem a enzima antioxidante foi de cerca de 13%, sendo esta diferença não considerada estatisticamente significativa (figura 12), enquanto que a SOD (40 e 80 U) não alterou a quantidade total de ferro liberada pela eupafolina (dados não mostrados).

Estes resultados indicam que no caso da eupafolina a liberação de ferro da ferritina pode estar relacionada com a geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que por consequência pode ter sido gerada pela autooxidação da molécula de flavona. Seria provável que esta auto-oxidação ocorresse, especialmente na presença de metais de transição, como o ferro, pelo fato da eupafolina possuir grupamentos hidroxila em posição orto, aspecto estrutural importante neste tipo de reação (MONTEIRO & WINTERBOURN, 1989).

Contudo, apesar da SOD não ter diminuído a liberação de ferro, não podemos descartar a possibilidade do radical  $\text{OH}^\bullet$  estar envolvido, pois segundo MONTEIRO & WINTERBOURN (1989) na presença de pequenas quantidades de metais de transição como o ferro ou o cobre, a auto-oxidação via uma reação que envolve um complexo ternário entre molécula-metal-oxigênio pode predominar e a inibição pela SOD deixa de ser observada (BANDY, 1987). Além disso, a eupafolina, assim como a hispidulina, foi dissolvida em DMSO, um conhecido sequestrador deste radical (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

FIGURA 10 – EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE A LIBERAÇÃO DE FERRO DA FERRITINA

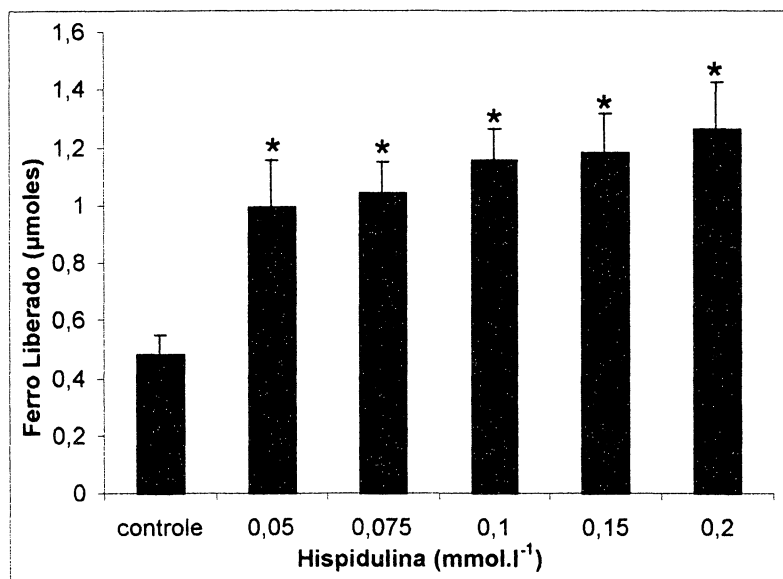
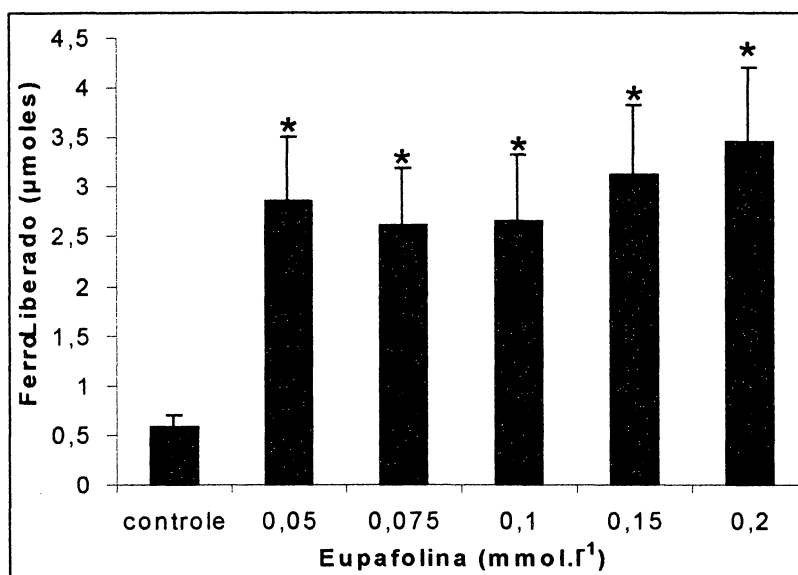


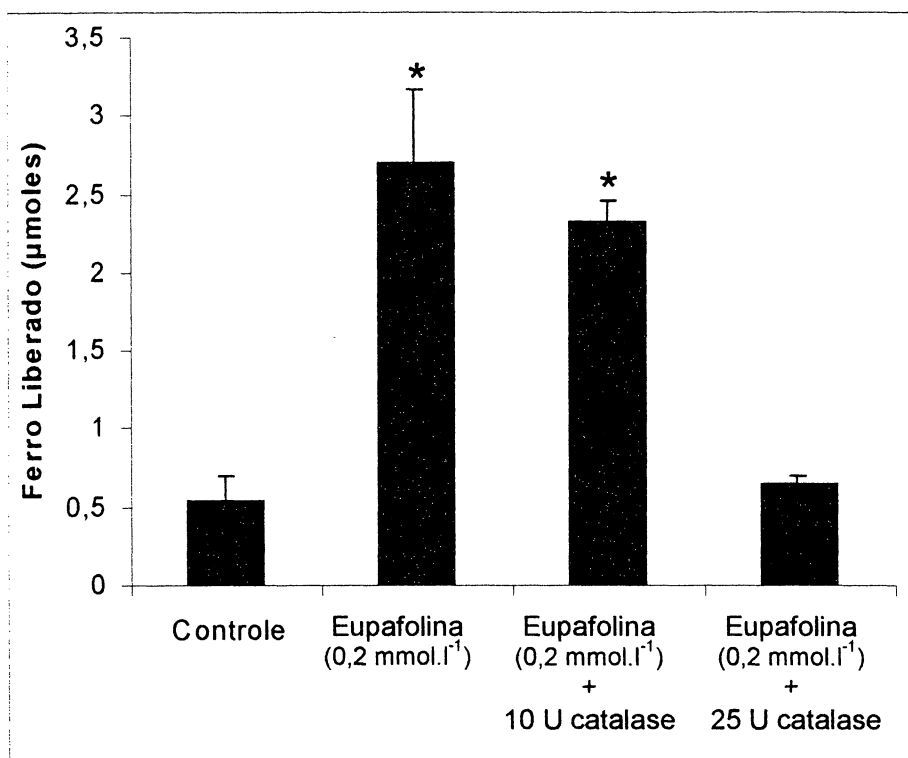
FIGURA 11 – EFEITOS DA EUPAFOLINA SOBRE A LIBERAÇÃO DE FERRO DA FERRITINA



Sistema de Reação: tampão Tris-HCl 20 mmol.l<sup>-1</sup>, NaCl 140 mmol.l<sup>-1</sup>, pH 7,3, sulfonato de batofenantrolina 1 mmol.l<sup>-1</sup>, ferritina 300 µg e hispidulina ou eupafolina nas concentrações indicadas, para dar início à reação, num volume final de 1ml. Os resultados foram obtidos acompanhando-se a formação do complexo Fe<sup>+2</sup>/batofenantrolina ( $\epsilon_{530nm}=22,14 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) a 530 nm. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão das triplicatas de 4 experimentos independentes realizados à temperatura de 28°C e estão expressos em µmoles de ferro liberado em 30 minutos

\* Valores estatisticamente significativos relativos ao controle –  $p \leq 0,05$ .

FIGURA 12 – EFEITOS DA EUPAFOLINA SOBRE A LIBERAÇÃO DE FERRO DA FERRITINA NA PRESENÇA DE CATALASE



Sistema de Reação: tampão Tris-HCl 20 mmol.l<sup>-1</sup>, NaCl 140 mmol.l<sup>-1</sup>, sulfonato de batofenantrolina 1 mmol.l<sup>-1</sup>, ferritina 300 µg, eupafolina 0,2 mmol.l<sup>-1</sup>, suplementado com catalase nas concentrações indicadas, em volume final de 1ml. Os resultados foram obtidos acompanhando-se a formação do complexo Fe<sup>+2</sup>/batofenantrolina ( $\epsilon_{530\text{nm}} = 22,14 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) a 530 nm, durante 30 minutos.

Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão das triplicatas de 4 experimentos independentes realizados à temperatura de 28°C e estão expressos em µmoles de ferro liberado em 30 minutos.

\* Valores estatisticamente significativos relativos ao controle (100%) –  $p \leq 0,05$ .

#### 4.6 REATIVIDADE DA HISPIDULINA E EUPAFOLINA COM O RADICAL LIVRE ESTÁVEL DPPH

A estrutura química da hispidulina e eupafolina sugere que estas moléculas poderiam participar de reações envolvendo radicais livres. A possibilidade destas flavonas atuarem como doadoras de elétrons, foi avaliada através da análise da sua interação com o radical livre estável difenilpicrilhidrazil (DPPH) com a finalidade de avaliar a habilidade das moléculas agirem como seqüestradoras de radical livre, atuando como antioxidantes (DINIS *et al.*, 1994). Segundo HOTTA *et al.*; (2002) o poder redutor da molécula é fator chave no desempenho antioxidante do composto. O DPPH pode aceitar um elétron ou um radical hidrogênio convertendo-se em uma molécula diamagnética estável (BLOIS, 1958). Devido ao seu elétron desemparelhado, o DPPH, que possui forte coloração violácea, absorve intensamente em 517 nm, a qual decresce estequiometricamente em relação ao número de elétrons captados (BLOIS, 1958), tornando-se gradativamente incolor. O ácido ascórbico livre, um conhecido antioxidante, foi utilizado neste trabalho como controle positivo e para comparação com os efeitos da hispidulina e eupafolina. Os resultados obtidos em tais experimentos estão demonstrados na figura 13.

Observa-se que a hispidulina não reduziu a absorbância da solução de DPPH em concentrações de até 0,2 mmol.l<sup>-1</sup>, demonstrando que não possui a propriedade de doar elétrons a este radical livre, não sendo portanto, um bom redutor. Este resultado está de acordo com os estudos de OKAWA *et al.* (1998; 2001), que testaram um flavonóide com estrutura química muito similar à da hispidulina, a isovitexina, que possui o mesmo número de grupamentos hidroxila e nas mesmas posições que a hispidulina, diferindo desta apenas por apresentar uma glucose em C-6 no anel A, observaram também que a isovitexina era incapaz de reagir com o DPPH em doses de até 1 mmol.l<sup>-1</sup>.

Entretanto, a eupafolina mostrou-se extremamente reativa frente a este radical, sendo seu efeito muito semelhante ao do ácido ascórbico, molécula conhecida por seu

forte poder redutor, com a dose de  $0,2 \text{ mmol.l}^{-1}$  a absorbância caiu aproximadamente 90% para ambas as moléculas. Este resultado mostra que o anel catecol presente na eupafolina faz grande diferença quanto à reatividade em relação à hispidulina, conforme indicam os dados da literatura (JOYEUX *et al.*, 1995; BURDA & OLESZEK, 2001). A comparação da potência de diferentes moléculas é melhor visualizada quando se considera a concentração capaz de promover 50% da atividade esperada. Estas concentrações são mais convenientemente expressas como  $I_{50}$  (-log de  $I_{50}$ , onde  $I_{50}$  é expressa em  $\text{mols.l}^{-1}$ ). Para o composto controle, o ácido ascórbico, o valor de  $I_{50}$  variou de 20 a  $25 \text{ } \mu\text{moles.l}^{-1}$ , para a hispidulina este valor ficou muito acima da dose máxima utilizada de  $0,2 \text{ mmol.l}^{-1}$ , enquanto que para a eupafolina o valor de  $I_{50}$  foi de  $15 \text{ } \mu\text{moles.l}^{-1}$ , ainda um pouco inferior ao do ácido ascórbico, o que mais uma vez demonstra a importância da diferença estrutural entre as duas flavonas.

BURDA & OLESZEK (2001) ainda apresentam outra maneira numérica para quantificar a atividade antiradical de uma determinada substância, que resulta na diminuição da intensidade da coloração da solução de DPPH frente a possível molécula “sequestradora” de radical, usando a seguinte equação:

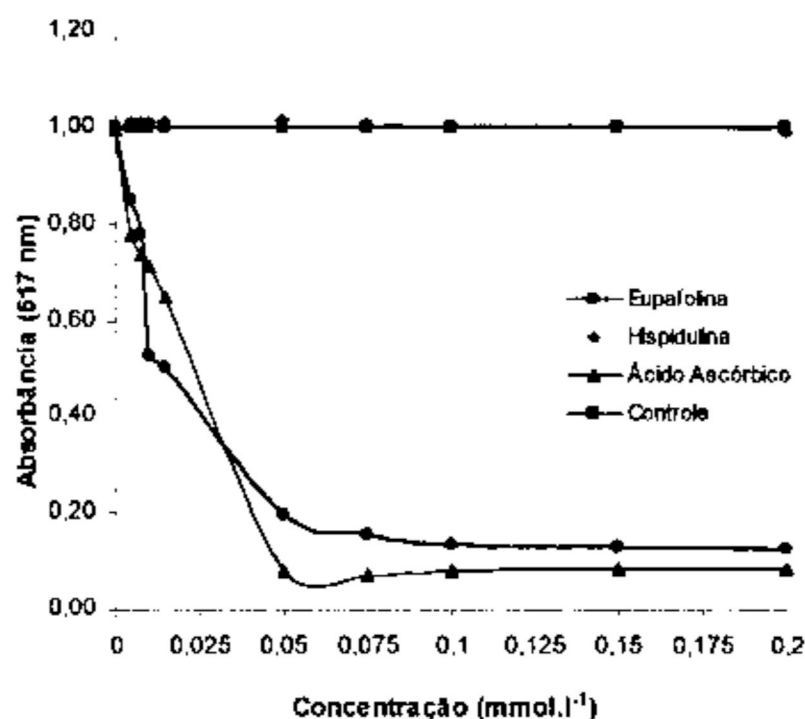
$$\text{Atividade "Antiradical"} = 100 \times 1 - (\text{absorbância da amostra} / \text{absorbância do controle})$$

Aplicando a fórmula acima para as moléculas testadas com as doses usualmente utilizadas ( $0,2 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) encontra-se um valor de  $r = 91,96$  para o composto referência, ácido ascórbico,  $r = 1,0$  para a hispidulina e  $r = 87,85$  para a eupafolina, valor que mais uma vez indica atividade antioxidante muito forte para esta última flavona. Estes resultados estão em concordância com obtidos por MIURA *et al.*, (2002), que através de ensaios muito semelhantes observaram que a eupafolina demonstrou reatividade com o DPPH semelhante aos compostos referência ácido ascórbico e  $\alpha$ -tocoferol. Moléculas que possuem padrão de hidroxilação semelhantes à eupafolina, especialmente a presença do grupo catecol no anel B, também demonstraram atividade “antiradical” elevada, como por exemplo a fisetina (3,7,3',4' tetrahidroxiflavona) e



quercetina (3,5,7,3',4' pentahidroxi-flavona) nas concentrações de  $33 \mu\text{mol.l}^{-1}$  que tiveram valores de  $r=79\%$  e  $89,8\%$ , respectivamente, com uma solução de  $16 \mu\text{mol.l}^{-1}$  de DPPH (BURDA & OLESZEK, 2001).

FIGURA 13 – EFEITO DA HISPIDULINA E EUPAFOLINA SOBRE O RADICAL LIVRE ESTÁVEL DPPH



Sistema de Reação em volume final de 1 ml: tampão acetato  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$  (pH 5,5), etanol e solução etanólica de DPPH  $50 \mu\text{moles.l}^{-1}$ . Os valores de absorbância foram obtidos após 5 minutos de reação. A redução do DPPH foi avaliada pelo decréscimo da absorbância a 517 nm, como função da concentração de hispidulina, eupafolina e o conhecido antioxidante ácido ascórbico.

A figura é representativa de 3 experimentos independentes.

## 5. DISCUSSÃO FINAL

A hispidulina, conforme demonstrado por ROCHA (2000)<sup>1</sup> reduziu a velocidade de consumo de oxigênio no estado III de mitocôndrias isoladas de fígado de rato na presença de glutamato e succinato como substratos oxidáveis. Acredita-se que este efeito seja consequência das inibições das atividades enzimáticas da cadeia respiratória provocadas pela hispidulina entre os complexos I e III, que iria restringir a passagem dos elétrons, através dos componentes da cadeia diminuindo o consumo de oxigênio. Na literatura coloca-se a necessidade da presença do grupo ceto em C-4 e de duplas ligações entre C-2 e C-3 para inibição de enzimas mitocondriais (HODNICK *et al.*, 1987; BOHMONT *et al.*, 1987), características estruturais inerentes à classe das flavonas da qual a hispidulina faz parte. Este efeito da hispidulina pode ser responsável pela sua citotoxicidade, podendo explicar pelo menos em parte os efeitos antineoplásicos verificados para a hispidulina em vários trabalhos.

ROCHA (2000)<sup>1</sup> também verificou que a hispidulina promove o estímulo do estado IV da respiração mitocondrial e decréscimo da razão ADP:O (tabelas 1 e 2), tanto na presença de glutamato quanto de succinato. Tais efeitos, aliados ao estímulo da ATPase em mitocôndrias intactas, também observado para a hispidulina no presente trabalho, podem ser considerados indicações de um possível efeito desacoplador da fosforilação oxidativa pela hispidulina. Estes resultados estão em concordância com aqueles observados por COLEMAN (1984) que observou também inibição do estado III e decréscimo da razão ADP:O com 50  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  e sugerindo a ocorrência de desacoplamento da fosforilação oxidativa pela hispidulina. Outras flavonas que possuem hidroxilas nas posições 5 e 7 também demonstraram efeito desacoplador sobre mitocôndrias animais e vegetais, como a platanetina (3,5,7,8-tetrahidroxi-6 dimetilalilflavona) cuja potência desacopladora é comparável ao FCCP, platanina (3,5,7,8-tetrahidroxi-6metilflavona) e 3 hidróxi-wogonina (3,5,7-trihidroxi-8-metóxi-flavona) (CRUZET *et al.*; 1998). RAVANEL (1986) observou que a apigenina (5,7,4'-trihidroxi flavona), flavonóide que também possui lipofilicidade e padrão de

<sup>1</sup> Comunicação pessoal do autor (2000).

hidroxilação bastante similar à hispidulina, foi classificada como um fraco desacoplador.

Ainda em relação aos efeitos inibitórios da hispidulina, através dos experimentos propostos por MORELAND (1994), a hispidulina foi classificada como um inibidor do transporte de elétrons, fato que é claramente demonstrado pelas inibições por ela provocadas sobre as enzimas da cadeia respiratória e sobre a velocidade respiratória do estado III, e confirmado pela sua capacidade de reduzir o consumo de oxigênio no estado III, mesmo na presença do FCCP.

Em mitocôndrias rompidas a hispidulina foi capaz de inibir a atividade da ATPase. Como nas preparações mitocondriais rompidas a membrana mitocondrial deixa de representar uma barreira, o acesso da droga à enzima é facilitado. A inibição direta da hispidulina sobre o complexo  $F_1F_0$  deve ser considerado, uma vez que foi demonstrado que o flavonóide quercetina (5,7,3',4' pentahidroxi 3-flavonol) por se ligar a uma das subunidades de  $F_1$ , atua como inibidor da transferência de energia (MORELAND, 1994). Como a hispidulina foi incapaz de afetar a atividade ATPásica de mitocôndrias intactas na presença do desacoplador clássico FCCP, pode-se excluir a possibilidade deste flavonóide estar afetando o translocador de nucleotídeos adenina.

Além dos efeitos citados anteriormente, as análises de inchamento mitocondrial na presença de substrato oxidável e acetato de sódio mostraram que a hispidulina inibe este parâmetro como uma consequência do seu efeito sobre a geração do potencial eletroquímico dos prótons, que pode ser explicado tanto em termos de inibições enzimáticas sobre as enzimas da cadeia respiratória, não sendo descartada a possibilidade de desvio de elétrons através de reações de óxido-redução uma vez que outros flavonóides apresentam esta característica (HODNICK *et al.*; 1986) e a hispidulina mostrou-se capaz de reduzir o 2,3,5-trifenil-tetrazólio (dados não mostrados). Além disso o efeito inibitório tão acentuado sobre o inchamento de mitocôndrias energizadas pode ser justificado também se considerarmos o efeito desacoplador da hispidulina, uma vez que relata-se que em concentrações bem baixas os desacopladores podem aumentar o inchamento (HANSTEIN; 1976; GOOCH &

PACKER, 1974) concentrações maiores, desacopladores como o 2-4 dinitrofenol e o FCCP inibem o inchamento (GOOCH & PACKER, 1974). Pode-se assim esperar efeito semelhante para a hispidulina, uma vez que é apontado que o efeito desacoplador dos flavonóides não seja diferente do mecanismo dos clássicos desacopladores fenóis clorados (RAVANEL; 1986). Contudo, os experimentos de inchamento com mitocôndrias desenergizadas indicaram que a hispidulina, aparentemente, não é capaz de afetar significativamente parâmetros relacionados com a permeabilidade da membrana ao íon  $K^+$  na presença de valinomicina, sendo necessários estudos futuros utilizando sondas fluorescentes para melhor avaliação dos efeitos da hispidulina sobre a fluidez da membrana mitocondrial interna.

Em relação aos estudos comparativos das propriedades antioxidantes e pró-oxidantes entre a hispidulina e a eupafolina, observou-se que ambas as moléculas são capazes de liberar ferro da ferritina, porém, a quantidade de ferro liberada pela eupafolina em trinta minutos foi cerca de 3 vezes maior em relação à hispidulina, o que pode ser explicado pela presença do anel catecol em sua estrutura, uma vez que outras moléculas que também possuem esta característica estrutural, como a 6-OH dopamina (6-OHDA), também demonstram ser capazes de liberar ferro da ferritina (MONTEIRO *et al.*; 1989).

Esta mobilização do ferro promovida pela eupafolina não foi afetada pela adição de SOD e pode ser diminuída pela presença de catalase, indicando a geração e envolvimento de  $H_2O_2$  no processo. Na presença de pequenas concentrações de ferro ou cobre a via de autooxidação envolve um complexo ternário entre 6-OHDA-metal-peróxido ou 6-OHDA-metal-oxigênio, que pode predominar e a inibição pela SOD não ser observada (BANDY *et al.*; 1987). Catalase e quelantes inibem este mecanismo e a autooxidação é dependente da propagação pelo  $O_2^{\bullet-}$ , sendo assim, pode-se sugerir que a eupafolina poderia estar promovendo liberação de ferro de ferritina por mecanismo semelhante ao da 6-OHDA e desta forma justificar os resultados obtidos com as enzimas antioxidantes.

Este efeito da eupafolina pode indicar uma possível atividade pró-oxidante da flavona menor do que o da hispidulina, uma vez que o ferro liberado da ferritina pode envolver-se em reações geradoras de espécies reativas de oxigênio e de radicais livres, como por exemplo através da reação de Fenton. Por outro lado, a eupafolina ( $I_{50} = 15 \mu\text{moles.l}^{-1}$ ) ao reagir com o radical livre estável DPPH, demonstrou efeitos similares ao do ácido ascórbico ( $I_{50} = 20\text{-}25 \mu\text{moles.l}^{-1}$ ), um forte agente redutor, podendo-se assim destacar suas propriedades antioxidantes, que também podem ser atribuídas à sua estrutura catecol, uma vez que esta característica estrutural é apontada como sendo muito importante em reações com radicais livres. A hispidulina que difere estruturalmente da eupafolina apenas pela presença deste grupo catecol, foi incapaz de reagir com o DPPH em concentrações de até  $0,2 \text{ mmol.l}^{-1}$ .

## 6. CONCLUSÕES

- ✓ A hispidulina pode ser classificada como um agente inibidor do transporte de elétrons e como um desacoplador da fosforilação oxidativa;
- ✓ A hispidulina inibe de forma estatisticamente significativa as atividades enzimáticas da NADH oxidase, NADH citocromo *c* redutase e NADH desidrogenase, com todas as doses testadas, inibe também as atividades da succinato oxidase (nas doses de 0,075, 0,1, 0,15, e 0,2 mmol.l<sup>-1</sup>) e succinato citocromo *c* redutase (nas doses de 0,1, 0,15, e 0,2 mmol.l<sup>-1</sup>), não interferindo de forma significativa sobre a atividade da citocromo *c* oxidase, sendo possível sugerir que seu sítio de ação seja entre os complexos I e III da cadeia respiratória mitocondrial;
- ✓ A hispidulina interfere no fenômeno de inchamento mitocondrial, reduzindo sua velocidade e amplitude quando utilizam-se mitocôndrias energizadas, porém não altera a velocidade e a amplitude do “swelling” mitocondrial em preparações desenergizadas, na presença de valinomicina e potássio;
- ✓ A hispidulina interfere na atividade ATPásica, provocando inibição quando utiliza-se mitocôndrias rompidas, estímulo em preparações mitocondriais intactas, porém quando na presença do FCCP não ocorrem modificações estatisticamente significativas na sua atividade;
- ✓ A hispidulina e eupafolina são capazes de liberar ferro da ferritina, sendo que para esta última o efeito é mais acentuado e o processo possivelmente é mediado por espécies reativas de oxigênio;
- ✓ A eupafolina é extremamente reativa frente ao radical livre estável DPPH, com efeito antioxidante comparável ao do ácido ascórbico, entretanto, a hispidulina não reagiu com o DPPH, não sendo portanto, um bom redutor.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA S.; ABU-ZARGA M.; AFIFI F.; AL-KHALIL S. & SABRI S. Effects of hispidulin, a flavone isolated from *Inula viscosa*, on isolated guinea-pig smooth muscle. **General Pharmacology**, New York, v. 19, n. 4, p. 559-563, 1988.

AFANAS'EV I. B.; OSTRAKHOVITCH E. A.; MIKHAL'CHIK E. V. Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoids rutin by complexation with transition metals. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 61, n. 6, p. 677-684, 2001.

AFANAS'EV I. B.; DOROZHKO A. I.; BRODSKII A. V.; KOSTIUK V. A.; POTAPOVITCH A. I. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 38, p. 1763-1769, 1989.

ANULAKANAPAKORN K.; BUNYAPRAPHATSARA N.; SATAYAIRVAD J. Phytochemical and pharmacological studies of the flowers of *Millingtonia hortensis*. **Journal of the Science Society of Thailand**, Bangkok, v.13, p. 71-83, 1987.

AREIAS F. M.; REGO A. C.; OLIVEIRA C. R. Antioxidant effect of flavonoids after ascorbate/ $\text{Fe}^{+2}$  induced oxidative stress in cultured retinal cells. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, n. 62, v. 1, p. 111-118, 2001.

ARORA A.; NAIR M. G.; STRASBURG G. M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a serie of flavonoids in a lipossomal system. **Free Radicals in Biology & Medicine**, New York, v. 24, n. 9, p. 1355-1363, 1998.

BANDY, B.; DAVISON A. J. Interaction between metals, ligands and oxygen in the autooxidation of 6 hydroxi-dophamine: Mechanisms by wich metal chelation enhances inhibition by superoxide dismutase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Orlando, v. 259, n. 2, p. 305-315, 1987.

BISNACK R.; BOERSMA B. J.; PATEL R. P.; KIRK M.; WHITE C. R.; DARLEY-USMAR V.; BARNES S.; ZHOU F.; PARKS D. A. Enhanced antioxidant activity after chlorination of quercetin by hipochlorous acid. **Alcoholism: Clinical & Experimental Research**, Baltimore, v. 25, n. 6, p. 434-443, 2001.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, London, v. 181, p. 1199-1200, 1958.

BOHMONT, C.; AARONSON, L. M.; MANN, K.; PARDINI, R. S. Inhibition of mitochondrial NADH oxidase, succinoxidase, and ATPase by naturally occurring flavonoids. **Journal of Natural Products**, Downers Grove, v. 50, p. 427-433, 1987.

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical scavenging efficiencies. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 186, p. 343-355, 1990.

BOURDILLAT, B.; DELAUTIER, D.; LABAT, C.; BENVENISTE, J.; POTIER, P. & BRINK, C. Hispidulin, a natural flavone, inhibits human platelet aggregation by increasing cAMP levels. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 147, p. 1-6, 1988.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, New York, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 6, p. 2774-2779, 2001.

CABRERA, A. Eupatorium (Subinbrucata) littorale nov sp. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, Buenos Aires, v. 7, n. 3-4, p. 189-91, 1959.

CANIGUERAL, S.; IGLESIAS, J.; HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Phenolic constituents of *Salvia lavandulifolia*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 55, n. 1, p. 92, 1989.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radicals in Biology & Medicine**, New York, v. 22, p. 749-760, 1997.



CARPENEDO, F.; BORTIGNON, C.; BRUNI A.; SANTI R. Effect of quercetin on membrane-linked activities. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 18, p. 1495-1500, 1969.

CHOLBI M. R.; PAYÁ M.; ALCARAZ M. J. Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl<sub>4</sub> induced microsomal lipid peroxidation. **Experientia**, Switserzland, v. 47, p. 195-199, 1991.

CHRISTENSEN L. P., LAM J. Flavones and other constituents from *Centaurea spp.* **Phytochemistry**, Kidlington, v. 30, n. 8, p. 2663-2666, 1991.

CHULASIRI M., BUNYAPRAPHATSARA N., MOONGKARNDI P. Mutagenicity and antimutagenicity of hispidulin and hortensin, the flavonoids from *Millingtonia hortensis*. **Environ Mol Mutag**, v. 20, n. 4, p. 307-312, 1992.

COLEMAN P.C.; POTGIETER D.J.J.; VAN ASWEGEN C.H. & VERMEULEN N.M.J. Flavonoids of *Geigeria* **Phytochemistry**, Kidlington, v. 23, n. 5, p. 1202-1203, 1984.

CORDANO G. F.; MUNOZ-de-la-PENA A.; MEDINA J.J. Scopoletin and hispidulin in *Baccaris magellanica*. **Journal of Natural Products**, Downers Grove, v.45 (sep-oct), p. 653, 1982.

COTELLE N.; BERNIER J. L.; HENICHART J. P.; CATTEAU J. P.; GAYDOU E.; WALLET J. C. Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic flavones. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, 13, p. 211-219, 1992.

COTELLE N.; BERNIER J. L.; CATTEAU J. P.; POMMERY J.; WALLET J.; GAYDOU E. M. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 20, p. 35-43, 1996.

CREUTZ, C.; SUTIN, N. Reduction of ferricytochrome c by dithionite ion: electron transfer by parallel adjacent and remote pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 70, n. 6, p. 1701-1703, 1973.

CREUZET S.; RAVANEL P.; TISSUT M.; KAOUADJI M. Uncoupling properties of three flavonols from plane-tree buds. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 27, n. 10, p. 3093-3099, 1988.

CRICHTON R.R. Proteins of iron storage and transport. **Advances in Protein Chemistry**, San Diego, v. 40, p. 281-363, 1990.

CRONQUIST A. **An integrated system of classification of flowering plants** v. 2. New York: Columbia University, 1981.

DAS N. P.; DEREIRA T. A. Effects of flavonoids on thermal autoxidation of palm oil: structure-activity relationships. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, Champaign, v. 67, p. 253-258, 1990.

De-PASCUAL T. J.; GONZALEZ M. S.; VICENTE S.; BELLIDO I. S. Flavonoids from *Chenopodium botrys*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 41 (apr), p. 389-391, 1981.

DINIS, T. C. P.; MADEIRA, V. M. C.; ALMEIDA, L. M. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and peroxy radical scavengers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Orlando, v. 315, n. 1, p. 161-169, 1994.

DUARTE J.; PEREZ-PALENCIA R.; VARGAS F.; OCETE M. A.; PEREZ-VISCAIO F.; ZARZUELO A.; TAMARGO J. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. **British Journal of Pharmacology**, Basingstoke, v. 133, n. 1, p. 117-124, 2001.

DOHERTY, G. O. P. HAYNES N. B.; XWHALLEY, W. B. 5, 7, 4'-Trihydroxy-6-methoxyflavone, a minor pigment from *Digitalis lanata*, L. **Journal of Chemical Society**, p. 5577-5578, 1963.

DUFFY S. J.; KEANEY J. F.; HOLBROOK M.; GOKCE N.; SWERDLOFF P. L.; FREI B.; VITA J. A. Short and long term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. **Circulation**, Baltimore, v. 104, n. 2, p. 161-156, 2001.

DUFFY S. J.; VITA J. A.; HOLBROOK M.; SWERDLOFF P. L.; KEANEY J. F. Effect of acute and chronic tea consumption on platelet aggregation in patients with artery coronary disease. **Arteriosclerosis Trombosis & Vascular Biology**, Baltimore, v. 21, n. 6, p. 1084-1089, 2001.

ELLATAR T. M. A.; VIRJI A. S. Effect of tea polyphenols on growth of oral squamous carcinoma cells in vitro. **Anticancer Research**, Attiki, v. 20, n. 58, p. 3459-3465, 2000.

ELEMA E.T.; SCHRIPSEMA J.; MALLINGRE T.M. Flavones and flavonol glycosides from *Eupatorium cannabinum* L. **Pharm Weekbl Sci**, n. 11, p. 161-164, 1989.

ELSOHLY M. A.; CARIG J. C.; TURNER C. E.; SHARMA A. S. Constituents of *Helenium amarum*. Part 2. Isolation and characterization of heleniamarin and other constituents. **Lloydia**, Cincinnati, v. 42 (sep-oct), p. 450-454, 1979.

ESTABROOK R.W. Mitochondrial respiratory control and the polarography measurement of ADP/O ratios. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 10, p. 41-47, 1967.

FARNSWORTH, N.R., BINGEL, A.S. In: Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. Great Britain: **Phytochemistry**, Kidlington, v. 30, n. 12, 1991.

FAURÉ M.; LISSI E.; TORRES R.; VIDELA L. A. Antioxidant activities of lignans and flavonoids. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 29, p. 3773-3775, 1990.

FERRALI M.; SIGNORINI B.; CACIOTTI B.; SUGHERINI L.; CICCOLI L.; GIACHETTI D.; COMPORTI M. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. **FEBS Letters**, Amsterdam, n. 416, p. 123-129, 1997.

FERRÁNDIZ M.L., BUSTOS G., PAYÁ M., GUNASEGARAN R., ALCARAZ M.J. Hispidulin protection against hepatotoxicity induced by bromobenzene in mice. **Pharmacology Letters**, v.55, n.8, p.145-150, 1994.

FIGUERAS, M. J.; GOSALVEZ, M. **European Journal of Cancer**, n. 9, p. 529, 1923.

FORD G.C.; HARRISON P.M.; RICE D.W.; SMITH J.M.A. TREFFRY A.; WHITE J.L. & YARIV Y. Ferritin: design and formation of an iron-storage molecule. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, London, v. 304B, p. 551-565, 1984.

FRAGA C. G., MARTINO V. S., FERRARO G. E., COUSSIO J. D., BOVERIS A. Flavonoids as antioxidants evaluated by vitro and situ liver chemiluminescence. **Biochemical Pharmacology**, New York, v.36, n.5, p. 717-720, 1987.

FREHSE F.L. **Flavonóides de *Eupatorium littorale* Cabrera e biotransformação de (±) flavonona pela *Gibberella fujikuroi***. Curitiba, 1999. Tese (Mestrado em Química) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

FULLAS F.; HUSSAIN R. A.; CHAI H. B. PEZZUTO J. M.; SOEJARTO D. D.; KINGHORN A. D. Cytotoxic constituents of *Baccharis gaudichaudiana*. **Journal of Natural Products**, Downers Grove, v. 57, n. 6, p. 801-807, 1994.

FUNK F.; LENDERS J.P.; CRICHTON R.R. & SCHNEIDER W. Reductive mobilization of ferritin iron. **European Journal of Biochemistry**., Paris, v. 152, p. 167-172, 1985.

FURHMAN B.; AVIRAM M. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. **Current Opinion in Lipidology**, London, v. 12, n. 1, p. 41-48, 2001.

GOOCH; V. D; PACKER L. Oscillatory systems in mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 346, p. 245-260, 1974.

HAENEN G. R. M. M.; PAQUAY J. B. G.; KORTHOUWER R. E. M.; BAST A. Peronytrite scavenging by flavonoids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 236, p. 591-593, 1997.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J.M.C.; ARUOMA O. I. The deoxyribose method: A simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 165, p.215-219, 1987.

HALLIWELL B. & GUTTERIDGE J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 186, p.1-85, 1990.

HALLIWELL B. & GUTTERIDGE J.M.C. **Free Radical Biology & Medicine**, 3. ed., Ed. Oxford University Press, New York, 1999.

HAMMERSTONE J. F.; LAZARUS S. A.; SCHMITZ H. H. Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, p. 2086S-2092S, 2000.

HANAWA F., TAHARA S., MIZUTANI J. Flavonoids produced by *Iris psedacorus* leaves treated with cupric chloride. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 30, n.7, p.2197-2198, 1991.

HANSAUL, A. C. **Efeitos do extrato bruto metanólico e da mistura hispidulina:eupafolina (1:1) de *Eupatorium litoralle* cabrera sobre SNC e musculatura esquelética e lisa não vascular.** Curitiba, 2002. Tese (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

HANSTEIN, W. G. Uncoupling of oxidative phosphorylation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 456, p. 129-148, 1976.

HARBORNE, J.B. **Comparative Biochemistry of the Flavonoids.** Academic Press; London and New York, 1967.

HARRISON P.M.; ANDREWS S.C.; ARTYMIUK P.J.; FORD G.C.; GUEST J.R.; HURZMANN J.; LAWSON D.M.; LIVINGSTONE J.C.; SMITH J.M.A.; TREFFRY & YEWDALL S.J. Probing structure-function relations in ferritin and bacterioferritin. **Advances in Inorganic Chemistry**, San Diego, v. 36, p. 449-486, 1991.

HARRISON P. M.; AROSIO P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1275, p. 161-203, 1996.

HAVSTEEN B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 32, n. 7, p. 1141-1148, 1983.

HAZEKAMP A.; VERPOORTE R.; PANTHONG A. Isolation of a bronchodilator flavonoid from the Thai medicinal plant *Clerodendrum petasites*. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 78, n. 1, p. 45-49, 2001.

HEIM K. E.; TAGLIAFERRO A. R.; BOBILYA D. J. Flavonoids antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Heim, v. 13, p. 572-584, 2002.

HENDRICKSON H. P.; KAUFMAN A. D.; LUNTE C. E. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 12, p. 147, 1994.  
HERTOG M. G. L.; FESKENS E. J. M.; HOLLMAN P. H. C.; KATAN M. B.; KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen earlier study. **Lancet**, Boston, v. 342, p. 1007-1011, 1993.

HEYTLER P. G. Uncouplers of oxidative phosphorylation. In: PACKER, L.; FLEISCHER S. **Selected methods in enzymology – Biomembranes**, San Diego: Academic Press, 1997, p. 613-623.

HODNICK W.F.; KUNG F.S.; ROETTGER W.J.; CRAIG W.B. & PARDINI R.S. Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 35, n.14, p. 2345-2357, 1986.

HODNICK W.F.; BOHMONT C.W.; CAPPS C. & PARDINI R.S. Inhibition of the mitochondrial NADH-oxidase (NADH-coenzyme Q oxido-reductase) enzyme system by flavonoids: a structure-activity study. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 36, n. 17, p. 2873-2874, 1987.

HODNICK W.F.; MILOSAVLJEVIC, E.B.; NELSON J. H.; PARDINI R.S. Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration, and production of oxygen radicals by flavonoids. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 37, n. 13, p. 2607-2611, 1988.

HODNICK W.F.; DAWN L.D. & PARDINI R.S. Inhibition of mitochondrial respiration and cyanide-stimulated generation of reactive oxygen species by selected flavonoids. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 537-580, 1994.

HOLLMAN P. C. H.; HERTOOG M. G. L.; KATAN, M. B. Analysis and health effects of flavonoids. **Food Chemistry**, Exter, v. 57, n. 1, p. 43-46, 1996.

HOTTA H.; NAGANO S.; UEDA M.; TSUJINO Y.; KOYAMA J.; OSAKAI T. Higher radical scavenging activities of polyphenolics antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1572, p. 123-132, 2002.

JONES T.; SPENCER R. & WALSH C. Mechanism and kinetics of iron release from ferritin by dihydroflavins and dihydroflavin analogues. **Biochemistry**, Washington, v. 17, p. 4011-4017, 1978.

JOYEUX, M.; LOBSTEIN A.; ANTON R.; MORTIER F. Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes and billavones from Ginkgo and some flavonoids. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 61, p. 126-129, 1995.

KOSTIUK V. A.; POTAPOVICH A. I.; VLADYKOVSKAYA E. N.; KORKINA L. G.; AFANAS'EV I. B. A. Influence of metal ions on flavonoid protection against asbestos-induced cell injury. **Archives of Biochemistry & Biophysics**, Orlando, v. 385, n.1, p. 129-137, 2001.

KUHNAU J. **World review of Nutrition and Dietetics**, Basel, n. 24, p. 117-191, 1976.

KUPCHAN S.M.; SIGEL C.W.; HEMINGWAY R.J.; KNOX J.R. & UDAYAMURTHY M.S. Citotoxic flavones from *Eupatorium* species. **Tetrahedron**, Kidlington, v. 25, n.8, p 1603-1615, 1969.

LARSON R. A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 27, p. 969-978.

LAI J. S., CHAN Y. F., HUANG K. F. Constituents from the stems of *Lantana camara*. **Chinese Pharmaceutical Journal**, Taipei, v.50, n. 6, p. 385-392, 1998.

LASKARIS G. G., GOURNELIS D. C., KOKKALOU E. Phenolics of *Picnomon acarna*. **Journal of Natural Products**, Downers Groove, v. 58, n. 8, p. 1248-1250, 1995.

LAUGHTON M. J.; HALLIWELL P.; EVANS P. J.; HOULT J. R. S. Antioxidant and prooxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myrecitin. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 38, n. 17, p. 2859-2865, 1989.

LEE K. H., ANUFORO D. C., HUANG E. S., PIANTADOSI C. Antitumor agents I. Angustibalin, a new cytotoxic sesquiterpene lactone from *Balduina angustifolia*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 61 (apr), p. 626-628, 1972.

LIMA, A. F. C; ROCHA, A. M. ROCHA; ROCHA, M. E. M; OLIVEIRA, B. H.; GOMES, M. A. B. Efeitos da hispidulina sobre o transporte de elétrons e atividades enzimáticas na cadeia respiratória mitocondrial. UFPR, Livro de Resumos EVINCI, 2001.

LIU L.; XIAO X.; ZHANG L.; ZHENG R.; LI Y.; DU M.; ZHU Z. Effects of flavones from *Saussurea involucrata* on DNA synthesis by cancer cells. **Lanzhou Daxue Xuebao**, Ziran Kexueban, v. 21, p. 80-83, 1985.

LIU Y. L., HO D. K., CASSADY J. M., COOK V. M., BAIRD W. M. Isolation of potencial cancer chemopreventive agents from *Erioduction californicum*. **Journal of Natural Products**, Downers Grove, v. 55, n. 3, p. 357-363, 1992.

LOWRY O. II; ROSEBROUGH N. J.; FARR A. C.; RANDALL R. J. Protein measurement with the polyphenol reagent, **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, p. 265-275, 1951.

MARCANO, D., MASAHISA, H. **Fitoquímica organica**. Caracas: Universidade Central de Venezuela, p.81, 1991.



MARKHAM, K.R. **Techniques of flavonoid identification**. Londres: Academic Press, 113 p., 1982.

MASON T.L.; POYTON R.O.; WHARTO D.C.; SCHATZ G. Cytochrome c oxidase from bakers yeast. Isolation and properties. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 248, n. 4, p. 1346-1354, 1973.

MATHIESEN L.; MALTERUD K. E.; SUND R. B. Hydrogen bond formation as basis for radical scavenging activity: a structure-activity of C-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale* and structurally related acetophenones. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 22, n. ½, p. 307-311, 1997.

MIDDLETON E. The flavonoids. **Trends in Pharmaceutical Sciences (TIPS)**, Kidlington, aug, p. 335-338, 1984.

MIDDLETON E. & KANDASWAMI C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. **The Flavonoids: Advances in Research Since 1986**, ed. J. B. Harborne. Chapman & Hall, London, p. 619-652. , aug, p. 335-338, 1984.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by chemiosmotic type mechanism. **Nature**, London, v. 191, p. 144-148, 1961.

MIURA K.; KIKUZAKI H.; NAKATANI N. Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 7, p. 1845-1851, 2002.

MIYAHARA M.; OHTAKA H.; KATAYAMA H.; TATSUMI Y.; MIYAICHI Y.; TOMIMORI T. Structure-activity relationship of flavonoids in supressing rat liver peroxidation. **Yakugaku-Zasshi**, Tokyo, v. 113, n. 2, p. 133-154, 1993.

MOINI-HADI; ARROYO-ANTONIO; VAYA -JACOB; PACKER-LESTER  
Bioflavonoid effects on the mitochondrial respiratory electron transport chain and  
cytochrome *c* redox state. **Redox Report**, Luds, v.4, n.1-2, 1999.

MONTEIRO H. P. & WINTERBOURN C.C. 6-hidroxydopamine releases iron from  
ferritin and promotes ferritin-dependent lipid peroxidation. **Biochemical  
Pharmacology**, Oxford, v. 38, p. 4177-4182, 1989.

MONTEIRO H. P., VILE G. F., WINTERBOURN C.C. Release of iron from ferritine  
by semiquinone, anthracycline, bipyridil, and nitroaromatic radicals. **Free Radical  
Biology & Medicine**, New York, v. 6, p. 587-591, 1989.

MONTEIRO H.P.; ABDALLA D.S.P.; AUGUSTO O. & BECHARA E.J.H. Free  
radical generation during  $\delta$ -aminolevulinic acid autoxidation: induction by hemoglobin  
and connection with porphyriopathies. **Archives of Biochemistry and Biophysics**,  
Orlando, v. 271, p. 206-216, 1989.

MORA A.; PAYÁ M.; RÍOS J. L.; ALCARAZ M. J. Structure-activity relationships of  
polymethoxy-flavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid  
peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 40, p. 793-797, 1990.

MORELAND, D. E. Effects of toxicants on oxidative phosphorylation and  
photophosphorylation. In: **Introduction to Biochemical Toxicology**, 2. Ed, Appleton &  
Langeity – New York, 1994.

MORENO, A.J.M. & MADEIRA, V.M.C. Interference of parathion with mitochondrial  
bioenergetics **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam., v.1015, p361-367, 1990.

MUSTAFA, M.G.; UTSUMI, K.; PACKER, L. Damped oscillatory control of  
mitochondrial respiration and volume. **Biochemical Biophysical Research  
Communications**, Orlando, v.24, p.381-385, 1966.

NAGASUGI T., KOMAI K. Antimutagens in the Brazilian folk medicinal plant carqueja  
(*Baccharis trimera* Less). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington,  
v. 46, n.7, p. 2560-2564, 1998.

NEGRETE R. E., LATORRE I., BACKHOUSE N., PENA R., DELPORTE C. Anatomical and phytochemical studies: Flavonoids and a lactone from *Centaurea chilensis* Hooker and Arnold **Plantes medicinales et Phytoterapie**, Angers, v. 22, n. 1, p. 1-10, 1988.

NICHOLLS, D. G.; FERGUSON S. J. **Bioenergetics 2** San Diego: Academic Press, 1992, 254 p.

NIJVELDT R. J.; van NOOD E.; van HOORN DEC; BOELEN P.G; van NORREN K.; van LEEUWEN P.A.M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications (Review). **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 74, n. 4, p. 418-425, 2001.

OKAWA M.; KINJO J.; NOHARA T.; ONO M. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. **Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects**, Amsterdam, v. 1526, n. 2, p. 159-167, 2001.

OLIVEIRA B. H.; NAKASHIMA T.; FILHO J. D. S.; FREHSE, F. L. HPLC analysis of flavonoids in *Eupatorium litorale*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 2, p. 243-246, 2001.

OTEIZA, P.I.; KLEINMAN, C.G.; DEMASI, M. & BECHARA, E.J.II. 5-aminolevulinic acid induces iron release from ferritin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Orlando, v.316, p.607-611, 1995.

PACKER L.; UTSUMI K.; MUSTAFA M. G. Oscillatory states of mitochondria I. Electron and energy transfer pathways. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Orlando, v. 117, p. 381-393, 1966.

PANNALA A. S.; CHAN T. S.; O'BRIEN P. J.; RICE-EVANS C. A. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: Fast reaction kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 282, n. 5, p. 1161-1168, 2001.

PEREIRA P. S., DIAS D. A., VICHNEWSKI W., NASI A. M. T. T., HERZ W. Sesquiterpene lactones from Brazilian *Tithonia diversifolia*. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 45, n. 7, p. 1445-1448, 1997.

PRESSMAN, B. C. Biological applications of ionophores. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 45, p. 501-530, 1976.

PULLMAN M.E.; PENEFSKY H.S.; DATTA A.; RACKER E. Partial resolution of the enzymes catalysing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble, dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 235, n. 11, p. 3322-3329, 1960.

PUPPPO A. Effects of flavonoids on hydroxyl radical formation by Fenton-type reactions, influence the iron chelator. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 31, n. 1 p. 85-88, 1992.

RAPTA P.; MISÍK V.; STASKO A.; VRÁBEL I. Redox intermediates of flavonoids and caffeic acid esters from Propolis: na EPR spectroscopy and cyclic voltametry study. **Free Radicals in Biology and Medicine**, New York, v.18, n. 5, p. 901-908; 1995.

RATTY A. K.; DAS N. P. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology**, Orlando, v. 39, n. 1, p. 69-79, 1988.

RAVANEL P. Uncoupling activity of a series of flavones and flavonols on isolated plant mitochondria. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 25, n.5, p. 1015-1020, 1986.

RICE-EVANS C. A.; MILLER N. J.; PAGANGA G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 20, p. 933-956, 1996.

RIOS J. L.; MANEZ S.; PAYÁ M.; ALCARAZ M. J. Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis javalambrensis*. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 31, p. 1947-1950.

ROBAK J.; GRYGLEWSKI R. J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 37, n. 5, p. 837-841, 1988.

ROCHA, M. E. M.; FERREIRA A. M. D. C.; BECHARA, E. J. H. Roles of phosphate and enoyl radical in ferritin iron mobilization by 5-aminolevulinic acid. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 29, n. 12, p. 1272-1279, 2000.

ROCHA, A. M. **Efeitos da hispidulina sobre parâmetros respiratórios mitocondriais utilizando glutamato e succinato como substratos oxidáveis.** Curitiba, 2000. – Comunicação pessoal do autor.

ROJAS A.; VILLENA R.; JIMENEZ A.; MATA R. Chemical studies on Mexican plantes used in traditional medicine, XXI. Ratibinolide II, a new sesquiterpene lactone from *Ratibida latipalearis*. **Journal of Natural Products**, Downers Grove, v. 54, n. 5, p. 1279-1282, 1991.

SANG J.L.; HA Y.C.; IN K.L.; SEUNG U. O.; ICK D. Y. Isolation and identification of flavonoids from ethanol extracts of *Artemisia vulgaris* and their antioxidant activity. **Korean Journal of Food Science and Technology**, v. 31, n. 3 , p. 815-822, 1999.

SANG J. L.; HA Y. C.; IN K. L.; SEUNG U. O.; ICK D. Y. Phenolics with inhibitory activity on mouse brain monoamine oxidase (MAO) from whole parts of *Artemisia vulgaris L.* **Food Science and Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 179-182, 2000.

SANTOS A.C.; UYEMURA S.A.; LOPES J.L.C.; BAZON J.N.; MINGATTO F.E. & CURTI C. Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 24, n. 9, p. 1455-1461, 1998.

SANZ M.J.; FERRANDIZ M.L.; CEJUDO M.; TERCENIO M.C.; GIL B.; BUSTOS G.; UBEDA A.; GUNASEGARAN R. & ALCARAZ M.J. Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress. **Xenobiotica**, London, v. 24, n.7, p. 689-699, 1994.

SCHRAMM D. D.; WANG J. F.; HOLT R. R.; ENSUNSA J. L.; GONSALVES J. L.; LAZARUS S. A. Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 73, n.1, p. 36-40, 2001.

SINGER T.P. Determination of the activity of succinate, NADH, choline and  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase. **Methods in Biochemical Analysis**, Weinheim, v. 22, p. 123-175, 1974.

SMITH, F. E. Tetrazolium salt. **Science**, Washington, v. 113, 29 jun., 1951.

SOICKE H., LENG P. E. Characterization of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. **Planta Medica**, Stuttgart, , v. 53, n. 1, p. 37-39, 1987.

SOMLO M. Induction des lactico-cytocromo c reductases (D – ET L -) de la levure aerobie par les lactates (D – ET L -). **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 97, p. 183-201, 1965.

SUMNER, J.B. Scientific apparatus and laboratory methods. A method for the colorimetric determination of phosphorus. **Science**, Washington, v.100, p. 413-414, 1944.

SYROV, V. N.; KHUSHBAKTOVA Z. A.; ABLAZORA M. K. H.; SULTANOV M. B. citados por HAZEKAMP A.; VERPOORTE R.; PANTHONG A. Isolation of a bronchodilator flavonoid from the Thai medicinal plant *Clerodendrum petasites*. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 78, n. 1, p. 45-49, 2001.

TAN R.X.; LU H.; WOLFENDER J. L.; YU T. T.; ZHENG W. F.; YANG L.; GAFNER S.; HOSTETTMANN K. Mono and sesquiterpenes and antifungal constituents from *Artemisia* species. **Planta Medica**, Stuttgart, . v. 65, n. 1, p. 64-67, 1999.

TOREL J.; CILLIARD J.; CILLIARD P. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 25, n. 2, p. 383-385, 1986.

TOYOKUNI, S. Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 20, p. 553-566, 1996.

TRICHOPULOU A.; VASILOUPOULOU E. Mediterranean diet and longevity. **British Journal of Nutrition**, n. 84 (S2), p. S205-S209, 2000.

TWAIJ H. A.; KERY A.; AL-KHAZRAJI N. K. Some pharmacological, toxicological and phytochemical investigations on *Centaurea phyllocephala*. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 9, n. 2-3, p. 299-314, 1983.

TZAGOLOFF, A. **Mitochondria**. New York: Plenum Press, 1982. 332 p.

UMIKALSOM Y., HARBORNE J. B. Flavonoid distribution in *Asplenoid ferns*. **PERTANIKA**, Malaysia, v. 14, n. 3, p. 297-300, 1991.

VALENTÃO P.; ANDRADE P. B.; AREIAS F.; FERRERES F.; SEABRA R. M. Analysis of vervain flavonoids by HPLC/ diode array detector method. Its application to quality control. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, Washington, v. 47, p. 4579-4582, 1999.

VALENZUELA A., LAGOS C.; SCHMIDT K.; VIDELA L. A. Silymarin protection against hepatic lipid peroxidation induced by acute ethanol intoxication in the rat. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 34, p. 2209-2212, 1985.

VALENZUELA A.; GUERRA R.; VIDELA L. A. Antioxidant properties of the flavonoids silybin and (+)-cyanidanol-3: comparison with butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 52, p. 438-440, 1986.

VAN ACKER, S.A.B.E.; BERG, D.J. ; TROMP, M.N.J.L.; GRIFFIOEN, D.H.; BENNEKOM, W.P.; VIJGH, W.J.F.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 20, n.3, p. 331-342, 1996.

VAN ACKER, S.A.B.E.; GROOT M. J.; VAN DER BERG, D-J.; TROMP, M. N.J.L.; DEN KELDER G. D-O; VAN DER VIJGH, W. J. F.; BAST, A. A quantum chemical explanations of the antioxidant activity of flavonoids. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 9, p. 1305-1312, 1996.

VASSANTHA R. P.; MURALI K. C.; ZIGLER S. J. Identification and characterization of enzyme activity of  $\zeta$ -crystallin from guinea pig lens. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 267, p. 96-102, 1992.

VIEIRA L. M.; KIJJOA A.; PEREIRA J. A.; GEDRIS T. E.; HERZ W. Germacranes and flavonoids from *Achillea ageratum*. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 45, n. 1, p. 111-115, 1997.

VOSS O.D.; CAMPELO A.P.; BACILA M. The respiration chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 4, n.1, p. 48-51, 1961.

WAN Y.; VINSON J. A.; ETHERTON T. D.; PROCH J.; LAZARUS S. A.; KRIS-ETHERTON P. Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 74, n. 5, p. 596-602, 2001.

WATT G. D.; FRANKEL R. B.; PAPAEFTHYMIU, G. C. Reduction of mammalian ferritin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 82, p. 3640-3643, 1985.

WENG, X. C.; REN G. P.; DUAN S.; DONG X. W.; JIANG A. L. Screening of natural antioxidants from Chinese medicines, herbs and spices. **Journal of the Chinese Cereal Oils Association**, v. 13, p. 46-48, 1998.

WEYANT M. J.; CAROTHERS A. M.; DANNENBERG A. J.; BERTAGNOLLI M. M. (+)-Catechin inhibits intestinal tumor formation and suppresses focal adhesion kinase activation in the Min/+ mouse. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 61, n. 1, p. 118-125, 2001.



WOERDENBAG H. J.; MERFORT I.; SCHIMIDT T. J.; PASSREITER C. M.; WILLUHN G.; VANUDEN W.; PRAS N.; KONINGS A. W. T. Decreased helenalin-induced cytotoxicity by flavonoids from Arnica as studied in human lung carcinoma cell line. **Phytomedicine**, Jena, v. 2, n.2, p. 127-132, 1995.

WOLLENWEBER E.; DIETZ V.H. Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 20, n. 5, p. 869, 1981.

YAMASHITA N.; KAWANISHI S. Distint mechanisms of DNA damage in apoptosis induced by quercetin and luteolin. **Free Radical Research**, v. 33, n.5, p. 623-633, 2000.

YANG C. S.; LANDAU J. M.; HUANG M. T.; NEWMARK H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v.21, p. 381-406, 2001.

YONETANI T., RAY G. S. Kinetics of the aerobic oxidation of ferrocytochrome *c* by cytochrome *c* oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.240, n.7, p. 3392-3398, 1965.

YUTING C.; RONGLIANG Z.; ZHONG JIAN J. & YONG J. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 9, p. 19-21, 1990.

ZHU Z.; LI C.; LIN. Eletrochemical studies of quercetin inteacting with DNA. **Microchemical Journal**, v. 71, p. 57-63, 2002.